

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-329766

(43)Date of publication of application : 30.11.2000

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

(21)Application number : 11-142868

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 24.05.1999

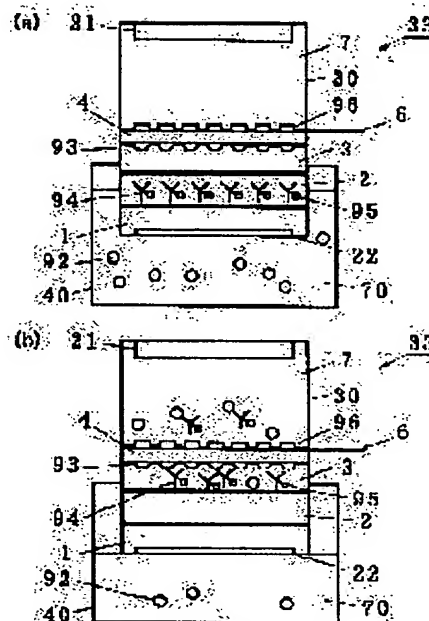
(72)Inventor : GOTO YUKIO
NAKAJIMA YUICHI

(54) IMMUNOASSAY AND ELEMENT THEREFOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide immunoassay capable of measuring the concentration of an antigen or antibody rapidly, simple and inexpensively.

SOLUTION: In immunoassay, a measuring element 33 is prepared to be impregnated with a solution 70 to be examined from one end thereof under negative pressure or by a capillary phenomenon and the infiltration of the solution into the measuring element 33 is advanced up to a region having an antibody, which can be bonded to an antigen 92 to be measured specifically and to which a label substance is bonded, supported thereon to mix the antibody with the solution 70 and, further, the solution 70 is infiltrated in the measuring element 33 up to the region having a standard antigen 93 fixed thereto positioned at the other end of the measuring element 33 to distribute the antibody between the standard antigen 93 and the antigen 92 by antigen-antibody reaction to form an antigen-antibody conjugate and the amount of the label substance contained in the antigen-antibody conjugate is measured to cover the amount of the label substance into the concentration of the antigen 92.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

12.03.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

THIS PAGE BLANK

(43)公開日 平成12年11月30日(2000.11.30)

521

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 21 頁)

(21)出願番号 特願平11-142868

(22)出願日 平成11年5月24日(1999.5.24)

(71)出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72)発明者 後藤 幸雄

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72)発明者 中島 祐一

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(74) 代理人 100097445

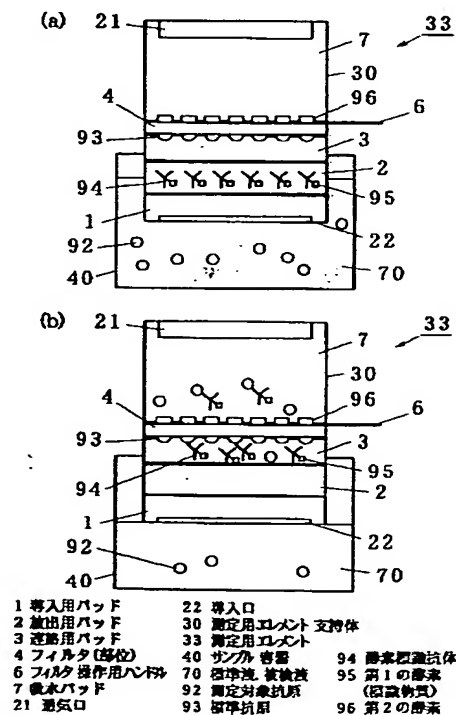
弁理士 岩橋 文雄 (外2名)

(54)【発明の名称】 免疫学的測定方法および免疫学的測定用エレメント

(57) 【要約】

【課題】 抗原または抗体の濃度を迅速簡便に低価格で測定できる免疫学的測定方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明の免疫学的測定方法は、測定用エレメント３３を用意し、被検液７０を測定用エレメントの一方端から負圧力または毛細管現象により含浸させ、測定対象抗原９２と特異的に結合することができ標識物質が結合された抗体を担持させた部位にまで測定用エレメント３３内の含浸をすすませて抗体を被検液７０に混入し、さらに測定用エレメント３３の他方端側に位置し標準抗原９３が固定化された部位にまで含浸がすすむと、標準抗原９３と測定対象抗原９２との間で抗体を抗原抗体反応によりそれぞれの抗原濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成し、この抗原抗体複合体に含まれる標識物質の量の測定を行い、測定対象抗原９２の濃度を標識物質の量より換算することの特徴とする。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】測定用エレメントを用意し、測定対象抗原を含有する被検液を前記測定用エレメントの一方端から負圧力または毛細管現象により含浸させ、前記測定対象抗原と特異的に結合することができ標識物質が結合された抗体を担持させた部位にまで前記測定用エレメント内の含浸をすすませて前記抗体を前記被検液に混入し、さらに前記測定用エレメントの他方端側に位置し標準抗原が固定化された部位にまで含浸がすすむと、前記標準抗原と前記測定対象抗原との間で前記抗体を抗原抗体反応によりそれぞれの抗原濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成し、前記標準抗原が固定化された部位の抗原抗体複合体に含まれる標識物質の量の測定を行い、前記測定対象抗原の濃度を前記標識物質の量より換算することを特徴とする免疫学的測定方法。

【請求項 2】測定用エレメントを用意し、測定対象抗体を含有する被検液を前記測定用エレメントの一方端から負圧力または毛細管現象により含浸させ、前記測定対象抗体と特異的に結合することができ標識物質が結合された抗原を担持させた部位にまで前記測定用エレメント内の含浸をすすませて前記抗原を前記被検液に混入し、さらに前記測定用エレメントの他方端側に位置し標準抗体が固定化された部位にまで含浸がすすむと、前記標準抗体と前記測定対象抗体との間で前記抗原を抗原抗体反応によりそれぞれの抗体濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成し、前記標準抗体が固定化された部位の抗原抗体複合体に含まれる標識物質の量の測定を行い、前記測定対象抗体の濃度を前記標識物質の量より換算することを特徴とする免疫学的測定方法。

【請求項 3】脱着自在なフィルタに測定対象抗原と同一種の標準抗原を一定量固定化し、多孔質で液体を吸収する第 1 の吸収体と第 2 の吸収体とが接触した状態で前記フィルタを挟んで配置し、前記測定対象抗原と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗体を含有した第 3 の吸収体を前記第 2 の吸収体に接触した状態で配置し、被検液を導入するための第 4 の吸収体を前記第 3 の吸収体に接触した状態で配置し、全体を気密性の密閉部材で覆い、前記密閉部材の前記第 4 の吸収体側に導入口を配置し、前記密閉部材の前記第 1 の吸収体側に通気口を配置した測定用エレメントを用意し、前記測定対象抗原を含有する被検液を前記測定用エレメントの導入口に接触させ、前記被検液を負圧または毛細管現象により前記第 4 の吸収体から前記第 1 の吸収体まで移動させ、前記第 3 の吸収体から前記抗体を前記被検液中に放出させ、前記フィルタに固定化された前記標準抗原と前記測定対象抗原とで前記抗体を抗原抗体反応によりそれぞれの抗原濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成させた後、前記フィルタを測定用エレメントより分離し、前記フィルタの前記標識物質量の測定をおこない、前記測定対象抗原の濃度を前記標識物質量より換算することを

特徴とする免疫学的測定方法。

【請求項 4】脱着自在なフィルタに測定対象抗体と同一種の標準抗体を一定量固定化し、多孔質で液体を吸収する第 1 の吸収体と第 2 の吸収体とが接触した状態で前記フィルタを挟んで配置し、前記測定対象抗体と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗原を含有した第 3 の吸収体を前記第 2 の吸収体に接触した状態で配置し、被検液を導入するための第 4 の吸収体を前記第 3 の吸収体に接触した状態で配置し、全体を気密性の密閉部材で覆い、前記密閉部材の前記第 4 の吸収体側に導入口を配置し、前記密閉部材の前記第 1 の吸収体側に通気口を配置した測定用エレメントを用意し、前記測定対象抗体を含有する被検液を前記測定用エレメントの導入口に接触させ、前記被検液を負圧または毛細管現象により前記第 4 の吸収体から前記第 1 の吸収体まで移動させ、前記第 3 の吸収体から前記抗原を前記被検液中に放出させ、前記フィルタに固定化された前記標準抗体と前記測定対象抗体との間で前記抗原を抗原抗体反応によりそれぞれの抗体濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成させた後、前記フィルタを測定用エレメントより分離し、前記フィルタの前記標識物質量の測定をおこない、前記測定対象抗体の濃度を前記標識物質量より換算することを特徴とする免疫学的測定方法。

【請求項 5】負圧力を発生する負圧発生手段を前記通気口に接続して、前記被検液の移動を行うことを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 に記載の免疫学的測定方法。

【請求項 6】前記標識物質が酵素であって、前記標識物質量の測定を吸光度を測定することにより行うことを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 に記載の免疫学的測定方法。

【請求項 7】前記標識物質が蛍光物質であって、前記標識物質量の測定を蛍光強度により行うことを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 に記載の免疫学的測定方法。

【請求項 8】前記標識物質の酵素を第 1 の酵素としたとき、前記フィルタの固相には抗原または抗体に加えて第 2 の酵素が固定化されていることを特徴とする請求項 6 に記載の免疫学的測定方法。

【請求項 9】前記フィルタの形状が多孔質状、不織布状、網状のいずれか 1 種類の形状または複数種類が複合した形状であることを特徴とする請求項 3 乃至 8 のいずれか 1 に記載の免疫学的測定方法。

【請求項 10】前記フィルタがニトロセルロース、ポリスチレン、ガラスのいずれか 1 種類の材質または複数種類が複合した材質であることを特徴とする請求項 3 乃至 9 のいずれか 1 に記載の免疫学的測定方法。

【請求項 11】前記フィルタの粒子保持能が $0.1 \mu\text{m}$ ～ $100 \mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項 3 乃至 10 のいずれか 1 に記載の免疫学的測定方法。

3

【請求項12】前記測定用エレメントを複数複合したことを特徴とする請求項3乃至11のいずれか1に記載の免疫学的測定方法。

【請求項13】免疫反応および酵素反応の温度を一定に保持する温度保持装置を備えたことを特徴とする請求項1乃至12のいずれか1に記載の免疫学的測定方法。

【請求項14】測定対象抗原と同一種の標準抗原を一定量固定化した脱着自在なフィルタと、前記フィルタに近接して配置された吸水パッドと、前記フィルタの前記吸水パッドと逆側に近接するように配置された連絡用パッドと、前記連絡用パッドの前記フィルタと逆側に近接するように配置され、前記測定対象抗原と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗体を含有した放出用パッドと、前記放出用パッドの前記連絡用パッドと逆側に近接するように配置された導入用パッドと、全体を覆う気密性の測定用エレメント支持体と、前記導入用パッドの前記放出用パッドと逆側に配置された導入口と、前記吸水パッドの前記フィルタと逆側に配置された通気口とを有することを特徴とする免疫学的測定用エレメント。

【請求項15】測定対象抗体と同一種の標準抗体を一定量固定化した脱着自在なフィルタと、前記フィルタに近接して配置された吸水パッドと、前記フィルタの前記吸水パッドと逆側に近接するように配置された連絡用パッドと、前記連絡用パッドの前記フィルタと逆側に近接するように配置され、前記測定対象抗体と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗原を含有した放出用パッドと、前記放出用パッドの前記連絡用パッドと逆側に近接するように配置された導入用パッドと、全体を覆う気密性の測定用エレメント支持体と、前記導入用パッドの前記放出用パッドと逆側に配置された導入口と、前記吸水パッドの前記フィルタと逆側に配置された通気口とを有することを特徴とする免疫学的測定用エレメント。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、溶液中の抗原または抗体の濃度を測定する免疫学的測定方法および免疫学的測定用エレメントに関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、抗原の一種であるアレルゲンが発症原因物質とされる花粉症等のアレルギー性鼻炎、アレルギー性気管支喘息、アトピー性皮膚炎等のいわゆるアレルギー疾患が、先進諸国を中心に増加傾向にあり、ダニ、花粉、動物の毛、カビ等の各種構成物質がその原因物質であることが特定されてきている。これらのアレルギー症状は比較的軽度の場合もあるが、アレルギー性気管支喘息のように死に至るほど重篤な場合もある。このため、感作、発症を抑制するための一つの手段として、各個人に特有な発症原因物質であるアレルゲンを低レベ

4

ルに維持することが必要になってくる。しかし、現状ではアレルゲンの測定は比較的難しい高度な技術とされ、専門の測定技術者を必要とし、半日から1日かかる長い測定時間を必要とし、かつ高価な測定装置が必要である。ところで、環境中のアレルゲン濃度とアレルギー疾患の感作・発症とは一般的に相関することが知られている。環境中のアレルゲン濃度の測定をおこなえば、掃除、洗濯等をどの程度おこなったり、どのくらいの頻度おこなえばよいのかの指標となり、アレルギー疾患患者やアレルギー疾患の感作の危険のある者にとって社会生活上有用なものとなる。また、アレルギー疾患患者の血液中のIgE抗体の濃度が即時型アレルギー反応のI型アレルギーの感作程度の指標になることも一般に知られており、血液中のIgE抗体濃度の測定が感作の程度ひいてはアレルギー疾患の程度を知るための指標としてきわめて有用である。

【0003】また、近年、病原性大腸菌O-157に代表されるバクテリア等の微生物の感染、代謝物に起因する食中毒等の被害が問題になっているが、問題となる微生物の検出は培養した後に種類の同定や定量することが一般的であり、培養操作に時間が掛かることを主因として検査結果が出るまで1〜7日間といった長時間を要し、かつ専門の測定技術者を必要とする。特に生鮮食品等への検査の必要が生じた場合には、測定時間が長いことが問題となる。ところで、このような微生物と上記した抗原は無縁のものではない。すなわち、菌体例えば病原性大腸菌O-157という名称は抗体の名前に由来しており、これは“抗O-157抗体が特異的に結合する抗原決定基を菌体表面に発現した病原性を有する大腸菌”の意味である。個々の微生物種はそれぞれ体表面に固有の抗原決定基を有しており、微生物自体を抗原と捉えることができる。以上のような理由で、微生物を抗原として同定、定量することが可能であり、生鮮食品等の検査にきわめて有用である。

【0004】このような背景から、抗原あるいは抗体の濃度をそれぞれ特異的、迅速、簡便さらに高感度に測定する方法およびその方法を利用した安価な測定装置が求められている。

【0005】以下、従来の抗原の濃度の測定方法について説明する。

【0006】従来の抗原抗体反応を利用した抗原の測定法は免疫学的測定法と総称され、非標識免疫学的測定法と標識免疫学的測定法とに大別される。非標識免疫学的測定法は抗体に酵素等の標識物質を結合せずに抗原抗体反応による物理量等の変化を利用して抗原の量を測定する方法である。非標識免疫学的測定法にはSPR法（表面プラズモン共鳴法）や水晶振動子を使った方法等がある。標識免疫学的測定法は抗体に酵素等の標識物質を結合させたものを使用し、標識物質量を測定することで抗原の量を測定する方法である。標識免疫学的測定法には

5

標識の種類によってラジオイムノアッセイ法（放射性同位体標識）、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法（例えば、石川英治ら：「酵素免疫測定法（第三版）」、p 31～54、医学書院（1987）を参照）等がある。

【0007】これらの測定法のうち現在主として用いられている免疫学的測定法は、酵素免疫測定法の一つであるELISA法と呼称される方法である。なかでも特に、サンドイッチ法（以下、「サンドイッチELISA法」という）と呼ばれる方法が、測定感度が高いことと比較的操作が簡易であることを主な理由に一般的に広く用いられている。例えば、ダニアレルゲンの測定をする場合を例にしてサンドイッチELISA法がどの様におこなわれるのかの概要を図13～図15に基づいて説明する。図13は従来のサンドイッチELISA法の主要工程を示す工程図であり、図14は従来のサンドイッチELISA法の反応工程の主要なステップを示すステップ図、図15（a）～（g）は測定用反応容器における反応を示す反応説明図である。図13、図14において、工程は大きな作業の流れを示し、ステップは工程の中の比較的細かい作業の流れを示すものである。

【0008】図13において、60は測定用反応容器作製工程B-1、61は反応工程B-2、62は測定工程B-3、63は演算工程B-4である。

【0009】また、図14において、64は固定化のステップB-2（a）、65は洗浄のステップB-2

（b）、66は酵素標識抗体の反応のステップB-2

（c）、67は洗浄のステップB-2（d）であり、図15において、1Aは測定用反応容器、91は抗体、92は抗原、94は酵素標識抗体、95は酵素である。

【0010】この方法は、図13に示すように、4段階の工程（B-1. 測定用反応容器作製工程60）、（B-2. 反応工程61）、（B-3. 測定工程62）および（B-4. 演算工程63）から構成される。

【0011】以下、この4段階の工程の各ステップについて説明する。

【0012】まずB-1. 測定用反応容器作製工程60について説明する。

【0013】これは抗体を測定用反応容器1Aに固定化して安定化状態とする工程である。以下に示す（a）～（e）のステップから構成される。

【0014】B-1（a）は抗原に特異的に結合する抗体91を測定用反応容器1Aに固定化するステップである。非特異的な吸着が起こり易い測定用反応容器1Aに、測定対象の抗原92に特異的に結合する抗体91の溶液を注ぎ、測定用反応容器1Aの固相に抗体91を非特異吸着させて固定化する。

【0015】B-1（b）は未反応の抗体91を洗浄除去するステップである。緩衝液等で3回以上測定用反応容器1Aを洗浄して、未反応であった抗体91を除去する。

6

【0016】B-1（c）はブロッキング剤で測定用反応容器1Aの非特異吸着面を被覆するステップである。測定用反応容器1Aにブロッキング剤溶液を注ぎ、測定用反応容器1Aの表面に残存する非特異吸着面にブロッキング剤を非特異吸着させ、以後他の有機物等の測定用反応容器1Aへの非特異的吸着が極力おこらないようにする。

【0017】B-1（d）は未反応のブロッキング剤を洗浄除去するステップである。緩衝液等で3回以上測定用反応容器1Aを洗浄して、未反応であったブロッキング剤を除去する。

【0018】B-1（e）は測定用の測定用反応容器1Aを保存可能とする処理をするステップである。保存手段として凍結乾燥法を用いて、測定用反応容器1Aを長期安定化した状態とする。

【0019】次に、B-2. 反応工程61について説明する。

【0020】これは抗原量に比例した量の酵素標識抗体を測定用反応容器1Aに固定化させる工程である。以下に示す（a）～（d）のステップから構成される。

【0021】B-2（a）は抗原92を測定用反応容器1Aに特異的に結合させるステップである。少なくとも4つの測定用反応容器1Aに、濃度が既知の標準抗原溶液2種類、抗原92を含有する被検液およびブランク液をそれぞれ注ぎ、それぞれ同条件下で平行して標準抗原または抗原92を測定用反応容器1A上の固定化抗体91を介して抗原抗体反応で特異的に結合させる。

【0022】B-2（b）は未反応の抗原92を洗浄除去するステップである。緩衝液等で3回以上測定用反応容器1Aを洗浄して、未反応であった抗原92を除去する。

【0023】B-2（c）は酵素標識抗体94を測定用反応容器1Aに特異的に結合させるステップである。測定用反応容器1Aに酵素標識抗体94溶液を注ぎ、酵素標識抗体94を測定用反応容器1A内の抗原抗体複合体の抗原92を介して抗原抗体反応で特異的に結合させる。

【0024】B-2（d）は未反応の酵素標識抗体94を洗浄除去するステップである。緩衝液等で3回以上測定用反応容器1Aを洗浄して、未反応であった酵素標識抗体94を除去する。

【0025】以上、各ステップの反応の説明を図15に示す。抗体91が固定化された測定用反応容器1Aを図15（a）に示し、測定用反応容器1Aへの抗原92含有溶液の添加を図15（b）に示し、時間経過による固定化抗体91と抗原92の抗原抗体反応の進行を図15（c）に示し、洗浄操作による未反応抗原92の除去を図15（d）に示し、測定用反応容器1Aへの酵素標識抗体94の添加を図15（e）に示し、測定用反応容器1Aへの酵素標識抗体94の抗原抗体反応の進行を図1

7

5 (f) に示し、洗浄操作による未反応酵素標識抗体 94 の除去を図 15 (g) に示す。

【0026】次に、B-3、測定工程 62 について説明する。

【0027】これは発色基質を添加して酵素反応で発色させ、発色の度合いを測定する工程である。以下に示す (a) ~ (c) のステップから構成される。

【0028】B-3 (a) は基質を酵素反応で発色させるステップである。基質溶液を測定用反応容器 1A に添加し、測定用反応容器 1A 内の酵素標識抗体 94 の酵素 95 に基質から酵素反応によって色素を生成させる。

【0029】B-3 (b) は酵素反応を停止させるステップである。反応停止液を測定用反応容器 1A に添加して酵素反応を停止させる。

【0030】B-3 (c) は発色波長における発色の度合いの測定ステップである。分光光度計の所定の波長で生じた色素を測定する。

【0031】最後に B-4、演算工程 63 について説明する。

【0032】これは標準抗原溶液の検量線より抗原濃度の換算を行う工程である。以下に示す (a) のステップから構成される。

【0033】B-4 (a) は換算ステップである。測定結果から標準抗原溶液の検量線を作成し、被検液の抗原濃度の換算をおこない、被検液の抗原濃度の値を得ることができる。

【0034】尚、以上が従来の抗原濃度の測定についての説明であるが、抗原と抗体を入れ替えて抗体を測定することでもまったく同一である。したがって、特に断らない限り、一方を説明したらもう一方も説明しているものである。特殊な場合にはある抗体の抗原決定基と特異的に結合する抗体の組み合わせでも前者が広い意味での抗原となっているとみなすことができる。必要に応じて抗原 (または抗体) あるいは抗体 (または抗原) と明示的に記載することとする。

【0035】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記した従来の免疫学的測定方法では、以下の問題点を有していた。

【0036】(a) 2 ステップの抗原抗体反応 (上記 B-2 (a)、B-2 (c)) が必要で、反応全てが完全に進行せねば正しい値が得られず、かつ全体で 4 ~ 24 時間程度と測定に要する時間が長い。特に精度を向上させるためには 24 時間程度を要し、測定時間が長いという問題点を有していた。

【0037】(b) 10 種類程度の異なる試薬を必要とし、また、2 ステップの洗浄操作 (上記 B-2 (b)、B-2 (d)) を行う必要があり、作業が煩雑で操作性が悪く利便性に欠けるという問題点を有していた。

【0038】(c) 試験を行うためには分注器、恒温

8

槽、冷蔵庫等が必要であり、測定コストが高いという問題点を有していた。

【0039】この免疫学的測定方法および免疫学的測定用エレメントでは、抗原または抗体の濃度を迅速簡便に低価格で測定できることが要求されている。

【0040】本発明は、抗原または抗体の濃度を迅速簡便に低価格で測定できる免疫学的測定方法および抗原または抗体の濃度を迅速簡便に低価格で測定するための免疫学的測定用エレメントを提供することを目的とする。

【0041】

【課題を解決するための手段】この課題を解決するために本発明の免疫学的測定方法は、測定用エレメントを用意し、測定対象抗原を含有する被検液を測定用エレメントの一方端から負圧力または毛細管現象により含浸させ、測定対象抗原と特異的に結合することができ標識物質が結合された抗体を担持させた部位にまで測定用エレメント内の含浸をすすませて抗体を被検液に混入し、さらに測定用エレメントの他方端側に位置し標準抗原が固定化された部位にまで含浸がすすむと、標準抗原と測定対象抗原との間で抗体を抗原抗体反応によりそれぞれの抗原濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成し、標準抗原が固定化された部位の抗原抗体複合体に含まれる標識物質の量の測定を行い、測定対象抗原の濃度を標識物質の量より換算する構成を備えている。

【0042】これにより、抗原または抗体の濃度を迅速簡便に低価格で測定できる免疫学的測定方法が得られる。

【0043】この課題を解決するために本発明の免疫学的測定用エレメントは、測定対象抗原と同一種の標準抗原を一定量固定化した脱着自在なフィルタと、フィルタに近接して配置された吸水パッドと、フィルタの吸水パッドと逆側に近接するように配置された連絡用パッドと、連絡用パッドのフィルタと逆側に近接するように配置され、標準抗原と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗体を含有した放出用パッドと、放出用パッドの連絡用パッドと逆側に近接するように配置された導入用パッドと、全体を覆う気密性の測定用エレメント支持体と、導入用パッドの放出用パッドと逆側に配置された導入口と、吸水パッドのフィルタと逆側に配置された通気孔とを有する構成を備えている。

【0044】これにより、抗原または抗体の濃度を迅速簡便に低価格で測定するための免疫学的測定用エレメントが得られる。

【0045】

【発明の実施の形態】本発明の請求項 1 に記載の免疫学的測定方法は、測定用エレメントを用意し、測定対象抗原を含有する被検液を測定用エレメントの一方端から負圧力または毛細管現象により含浸させ、測定対象抗原と特異的に結合することができ標識物質が結合された抗体を担持させた部位にまで測定用エレメント内の含浸をす

10

20

30

40

50

9

すませて抗体を被検液に混入し、さらに測定用エレメントの他方端側に位置し標準抗原が固定化された部位にまで含浸がすすむと、標準抗原と測定対象抗原との間で抗体を抗原抗体反応によりそれぞれの抗原濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成し、標準抗原が固定化された部位の抗原抗体複合体に含まれる標識物質の量の測定を行い、測定対象抗原の濃度を標識物質の量より換算することとしたものである。

【0046】この構成により、操作を簡単なものとするので、抗原または抗体の濃度を迅速簡便に低価格で測定することができるという作用を有する。

【0047】請求項2に記載の免疫学的測定方法は、測定用エレメントを用意し、測定対象抗体を含有する被検液を測定用エレメントの一方端から負圧力または毛細管現象により含浸させ、測定対象抗体と特異的に結合することができ標識物質が結合された抗原を担持させた部位にまで測定用エレメント内の含浸をすすませて抗原を被検液に混入し、さらに測定用エレメントの他方端側に位置し標準抗体が固定化された部位にまで含浸がすすむと、標準抗体と測定対象抗体との間で抗原を抗原抗体反応によりそれぞれの抗体濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成し、標準抗体が固定化された部位の抗原抗体複合体に含まれる標識物質の量の測定を行い、測定対象抗体の濃度を前記標識物質の量より換算することとしたものである。

【0048】この構成により、操作を簡単なものとするので、抗原または抗体の濃度を迅速簡便に低価格で測定することができるという作用を有する。

【0049】請求項3に記載の免疫学的測定方法は、脱着自在なフィルタに測定対象抗原と同一種の標準抗原を一定量固定化し、多孔質で液体を吸収する第1の吸収体と第2の吸収体とが接触した状態で前記フィルタを挟んで配置し、測定対象抗原と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗体を含有した第3の吸収体を第2の吸収体に接触した状態で配置し、被検液を導入するための第4の吸収体を第3の吸収体に接触した状態で配置し、全体を気密性の密閉部材で覆い、密閉部材の第4の吸収体側に導入口を配置し、密閉部材の第1の吸収体側に通気口を配置した測定用エレメントを用意し、測定対象抗原を含有する被検液を測定用エレメントの導入口に接触させ、被検液を負圧または毛細管現象により第4の吸収体から第1の吸収体まで移動させ、第3の吸収体から抗体を被検液中に放出させ、フィルタに固定化された標準抗原と測定対象抗原とで抗体を抗原抗体反応によりそれぞれの抗原濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成させた後、フィルタを測定用エレメントより分離し、フィルタの標識物質量の測定をおこない、測定対象抗原の濃度を標識物質より換算することとしたものである。

【0050】この構成により、別途作製され保存された

10

上記測定用エレメントを用いることで測定を簡便・迅速化することができ、また、抗原抗体反応は被検液と測定用エレメントの接触を行うときの一回であるため短時間のうちに、かつ複数回の反応であるならば各反応間に必要となる洗浄を不要化することができ、測定用エレメントの脱着自在なフィルタに固定化された一定量の標準抗原と測定対象抗原によって、被検液が測定用エレメントを通過する際に、放出用パッドから標準抗原と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗体が被検液に溶解し、溶解した上記抗体をそれぞれの抗原濃度に応じて所定の割合に分配させ、分配された抗体の量と標識物質との間には所定の関係があるため、フィルタと結合した標識物質量を測定することによって、測定対象抗原の濃度を算出することができるという作用を有する。ここで、標準抗原としては、濃度既知の抗原である菌体やアレルゲンの溶液が用いられる。標準抗原溶液の濃度は、アレルゲンの場合には $0.0001 \mu\text{g/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 、好ましくは $0.001 \mu\text{g/mL} \sim 10 \mu\text{g/mL}$ が用いられる。標準抗原の濃度は、アレルゲンの場合 $0.001 \mu\text{g/mL}$ よりも少なくなるにつれ、充分な抗原量をフィルタに固定化することが不可能となる傾向が認められ、また、アレルゲンの場合 $10 \mu\text{g/mL}$ よりも多くなるにつれ、吸着量が飽和して未反応の抗原が増加し、経済性が悪くなるという傾向が認められるので、いずれも好ましくない。標準抗原溶液の溶媒としては、りん酸緩衝液、ホウ酸緩衝液が用いられる。他の溶液でpHを一定に保持することができるものでもよい。上記緩衝液に塩類、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウムを溶解して使用するのが好ましい。緩衝液のpHとしてはpH5～pH9、好ましくはpH6～pH8が用いられる。緩衝液のpHがpH6より小さくなるにつれ、安定な抗原の非特異吸着を測定用反応容器に発生させることができないという傾向が認められ、またpH8よりも大きくなるにつれても、安定な抗原の非特異吸着を測定用反応容器に発生させることができないという傾向が認められるので、いずれも好ましくない。

【0051】請求項4に記載の免疫学的測定方法は、脱着自在なフィルタに測定対象抗体と同一種の標準抗体を一定量固定化し、多孔質で液体を吸収する第1の吸収体と第2の吸収体とが接触した状態でフィルタを挟んで配置し、測定対象抗体と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗原を含有した第3の吸収体を第2の吸収体に接触した状態で配置し、被検液を導入するための第4の吸収体を第3の吸収体に接触した状態で配置し、全体を気密性の密閉部材で覆い、密閉部材の第4の吸収体側に導入口を配置し、密閉部材の第1の吸収体側に通気口を配置した測定用エレメントを用意し、測定対象抗体を含有する被検液を測定用エレメントの導入口に接触させ、被検液を負圧または毛細管現象により第4の吸収体から第1の吸収体まで移動させ、第3の吸収体から抗

11

原を被検液中に放出させ、フィルタに固定化された標準抗体と測定対象抗体との間で抗原を抗原抗体反応によりそれぞれの抗体濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成させた後、フィルタを測定用エレメントより分離し、フィルタの標識物質量の測定をおこない、測定対象抗体の濃度を標識物質より換算することとしたものである。

【0052】この構成により、別途作製され保存された上記測定用エレメントを用いることで測定を簡便・迅速化することができ、また、抗原抗体反応は被検液と測定用反応容器の接触を行うときの一回であるため短時間のうちに、かつ複数回の反応であるならば各反応間に必要となる洗浄を不要化することができ、測定用反応容器に固定化された一定量の標準抗体と測定対象抗体によって、被検液に添加した上記抗原をそれぞれの抗体濃度に応じて所定の割合に分配させ、分配された抗原の量と標識物質との間には所定の関係があるため、測定用反応容器または被検液と結合した標識物質量を測定することによって、測定対象抗体の濃度を算出することができるという作用を有する。ここで、標準抗体としては抗原である菌体またはアレルゲンに特異的な結合能を有するモノクロナール（またはポリクロナール）抗体が用いられる。標準抗体溶液の濃度は $0.0001\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは $0.001\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $10\mu\text{g}/\text{mL}$ が用いられる。標準抗体の濃度が $0.001\mu\text{g}/\text{mL}$ よりも少なくなるにつれ、充分な抗体量を測定用反応容器に接触し非特異吸着により固定化することが不可能となる傾向が認められ、また、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ よりも多くなるにつれ、吸着量が飽和して未反応の抗体が増加し、経済性が悪くなる傾向が認められるので、いずれも好ましくない。

【0053】請求項5に記載の免疫学的測定方法は、請求項1乃至4のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、負圧力を発生する負圧発生手段を通気口に接続して、被検液の移動を行うこととしたものである。

【0054】この構成により、安定的な被検液の移動や、速い被検液の移動、自由度の高い配置方向の提供を行うことができるため、精度良く、迅速に、自由度高く抗原または抗体を測定することができるという作用を有する。

【0055】請求項6に記載の免疫学的測定方法は、請求項1乃至5のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、標識物質が酵素であって、標識物質量の測定を吸光度を測定することにより行うこととしたものである。

【0056】この構成により、酵素を利用することで、迅速に、容易に、安価に抗原または抗体を測定することができるという作用を有する。ここで、酵素としては、ペルオキシダーゼ、 β ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼが用いられる。

12

【0057】請求項7に記載の免疫学的測定方法は、請求項1乃至5のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、標識物質が蛍光物質であって、標識物質量の測定を蛍光強度により行うこととしたものである。

【0058】この構成により、蛍光物質を利用することで、迅速に、容易に抗原または抗体を測定することができるという作用を有する。

【0059】請求項8に記載の免疫学的測定方法は、請求項6に記載の免疫学的測定方法において、標識物質の酵素を第1の酵素としたとき、フィルタの固相には抗原または抗体に加えて第2の酵素が固定化されていることとしたものである。

【0060】この構成により、酵素を利用することで、標識物質としての酵素の基質を第2の酵素により供給することで測定用発色基質液の調整を簡便にできるという作用を有する。ここで、標識物質としての酵素はペルオキシダーゼで、第2の酵素はグルコースオキシダーゼでの組み合わせ等を用いることができる。

【0061】請求項9に記載の免疫学的測定方法は、請求項3乃至8のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、フィルタの形状が多孔質状、不織布状、網状のいずれか1種類の形状または複数種類が複合した形状であることとしたものである。

【0062】この構成により、抗原または抗体が吸着する単位体積当たりの表面積を大きくすることができ、抗原抗体反応を短時間かつ容易に行うことができるという作用を有する。

【0063】請求項10に記載の免疫学的測定方法は、請求項3乃至9のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、フィルタがニトロセルロース、ポリスチレン、ガラスのいずれか1種類の材質または複数種類が複合した材質であることとしたものである。

【0064】この構成により、フィルタへの抗原または抗体の単位面積当たりの吸着量を大きくすることができ、抗原抗体反応を短時間かつ容易に行うことができるという作用を有する。

【0065】請求項11に記載の免疫学的測定方法は、請求項3乃至10のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、フィルタの粒子保持能が $0.1\mu\text{m}$ ～ $100\mu\text{m}$ であることとしたものである。

【0066】この構成により、被検液が濁質を含有するために測定への影響がある場合、フィルターの上流部にて該濁質を捕捉し、抗原抗体反応をフィルタ内部において濁質の影響を排除して行え、濁質除去等の前処理を必要としないため測定を簡便かつ短時間に行うことができるという作用を有する。

【0067】請求項12に記載の免疫学的測定方法は、請求項3乃至11のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、測定用エレメントを複数複合することとしたものである。

13

【0068】この構成により、複数の被検液を同時に測定できるようになり、一検体当たりの測定を簡便かつ短時間に行うことができるという作用を有する。

【0069】請求項13に記載の免疫学的測定方法は、請求項1乃至12のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、免疫反応および酵素反応の温度を一定に保持する温度保持装置を備えることとしたものである。

【0070】この構成により、反応が最適化し、安定化されるようになり、測定を短時間に安定して行うことができるという作用を有する。

【0071】請求項14に記載の免疫学的測定用エレメントは、測定対象抗原と同一種の標準抗原を一定量固定化した脱着自在なフィルタと、フィルタに近接して配置された吸水パッドと、フィルタの前記吸水パッドと逆側に近接するように配置された連絡用パッドと、連絡用パッドのフィルタと逆側に近接するように配置され、測定対象抗原と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗体を含有した放出用パッドと、放出用パッドの連絡用パッドと逆側に近接するように配置された導入用パッドと、全体を覆う気密性の測定用エレメント支持体と、導入用パッドの放出用パッドと逆側に配置された導入口と、吸水パッドのフィルタと逆側に配置された通気口とを有することとしたものである。

【0072】この構成により、測定対象抗原を含有する被検液をサンプル容器に注ぎ、被検液と測定用エレメントの導入口を接触させ、被検液を負圧または毛細管現象により上昇させ、放出用パッドから抗体を被検液中に放出させ、フィルタに固定化された標準抗原と測定対象抗原との間で抗体を抗原抗体反応によりそれぞれの抗原濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成させた後、フィルタを測定用エレメントより分離し、フィルタの標識物質量の測定をおこない、測定対象抗原の濃度を該標識物質量より換算することができるという作用を有する。また、免疫学的測定用エレメントにより測定を簡便・迅速化することができ、さらに、抗原抗体反応は被検液と測定用反応容器の接触を行うときの一回であるため短時間のうちに、かつ複数回の反応であるならば各反応間に必要となる洗浄を不要化することができ、測定用反応容器に固定化された一定量の標準抗原と測定対象抗原によって、被検液に添加した抗体をそれぞれの抗原濃度に応じて所定の割合に分配させ、分配された抗体量と標識物質には所定の関係があるため、測定用反応容器または被検液と結合した標識物質量を測定することによって、測定対象抗原の濃度を算出することができるという作用を有する。

【0073】請求項15に記載の免疫学的測定用エレメントは、測定対象抗体と同一種の標準抗体を一定量固定化した脱着自在なフィルタと、フィルタに近接して配置された吸水パッドと、フィルタの吸水パッドと逆側に近接するように配置された連絡用パッドと、連絡用パッド

14

のフィルタと逆側に近接するように配置され、測定対象抗体と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗原を含有した放出用パッドと、放出用パッドの連絡用パッドと逆側に近接するように配置された導入用パッドと、全体を覆う気密性の測定用エレメント支持体と、導入用パッドの放出用パッドと逆側に配置された導入口と、吸水パッドのフィルタと逆側に配置された通気口とを有することとしたものである。

【0074】この構成により、測定対象抗体を含有する被検液をサンプル容器に注ぎ、被検液と測定用エレメントの導入口を接触させ、被検液を負圧力または毛細管現象により上昇させ、放出用パッドから抗原を被検液中に放出させ、フィルタに固定化された標準抗体と測定対象抗体との間で抗原を抗原抗体反応によりそれぞれの抗体濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成させた後、フィルタを測定用エレメントより分離し、フィルタの標識物質量の測定をおこない、測定対象抗体の濃度を該標識物質量より換算することができるという作用を有する。また、免疫学的測定用エレメントにより測定を簡便・迅速化することができ、さらに、抗原抗体反応は被検液と測定用反応容器の接触を行うときの一回であるため短時間のうちに、かつ複数回の反応であるならば各反応間に必要となる洗浄を不要化することができ、測定用反応容器に固定化された一定量の標準抗体と測定対象抗体によって、被検液に添加した抗原をそれぞれの抗体濃度に応じて所定の割合に分配させ、分配された抗原量と標識物質との間には所定の関係があるため、測定用反応容器または被検液と結合した標識物質量を測定することによって、測定対象抗体の濃度を算出することができるという作用を有する。

【0075】以下、本発明の実施の形態について、図1～図12を用いて説明する。

【0076】（実施の形態1）本発明の実施の形態1では、抗体が特異的に結合する抗原決定基を有するアレルゲンを抗原とし、分離用固体を使用してアレルゲン濃度を測定する免疫学的測定方法および免疫学的測定装置について説明する。以下抗原の測定について説明するが、例えばアレルゲン（抗原）に対する血清中の抗体量を測定する等、抗原と抗体を逆にすることも可能である。こうした理由から抗体の測定に関する説明は省略する。

【0077】図1は本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントの概略断面図であり、図4（a）、

（b）は本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した反応工程の接触のステップを説明するためのエレメント・サンプル容器の概略断面図、図5

（a）、（b）は本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した反応工程の洗浄のステップを説明するためのエレメント・サンプル容器の概略断面図、図6（a）、（b）は本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した測定工程の発色の

15

ステップを説明するための測定容器の概略断面図、図10は本発明の実施の形態1における反応工程の発色ステップでのフィルタと測定容器の部分拡大図、図11は本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントの断面図である。

【0078】図1、図4～図6、図10および図11において、1は負圧力または毛細管現象により被検液を含浸させることができる多孔質状、不織布状、網状等の形状をもつ含浸体から構成された導入用パッド（第4の吸収体）、2は同じく含浸体から構成された放出用パッド（第3の吸収体）、3は同じく含浸体から構成された連絡用パッド（第1の吸収体）、4は同じく含浸体から構成され、後記する免疫学的測定用エレメントに着脱自在のフィルタ、5はフィルタ4を物理的に支持するためのフィルタ支持枠、6はフィルタ操作ハンドル、7は同じく含浸体から構成された吸水パッド（第2の吸収体）、21は通気口、22は導入口、30は毛細管現象を利用できるように周囲を覆う気密性の密閉部材である測定用エレメント支持体、33は免疫学的測定用エレメント、34は通気口21が設けられた測定用エレメント上部蓋、35は通気口21が設けられた測定用エレメント下部蓋、36はフィルタ支持枠5と測定用エレメント支持体30をシールするためにフィルタ支持枠5に設けたOリング、40は被検液70、洗浄液71（後述）等を保持し、免疫学的測定用エレメント33の導入口22に被検液70、洗浄液71等を接触させるためのサンプル容器、41はフィルタ4への酵素標識抗体94（後述）の反応の程度を測定するための測定容器、70は標準液（または被検液）、71は洗浄液、72は基質溶液、92は測定対象抗原（被検液由来の抗原）、93はフィルタ4に固定化させた標準抗原、94は酵素標識抗体、95は標識物質としての第1の酵素、96は第2の酵素である。

【0079】また、図2は本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した主要な工程を示す工程図であり、図3は本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した主要なステップを示すステップ図である。

【0080】図2、図3において、50はA-1. 測定用エレメント作製工程、51はA-2. 反応工程、52はA-3. 測定工程、53はA-4. 演算工程、54はA-2（a）接触のステップ、55はA-2（b）. 洗浄のステップ、56はA-3（b）. 発色のステップである。ここで、工程は大きな作業の流れを示し、ステップは工程の中の比較的細かい作業の流れを示す。

【0081】また、図7は本発明の実施の形態1におけるフィルタの斜視図であり、図8は本発明の実施の形態1における免疫学的測定用エレメントの斜視図、図9は本発明の実施の形態1における測定容器の斜視図である。

16

【0082】図7、図8および図9において、4は図1等と同様のフィルタ、5は図11と同様のフィルタ支持枠、6は図1等と同様のフィルタ操作ハンドル、21は図1等と同様の通気口、30は図1等と同様の測定用エレメント支持体、31は測定用エレメント支持体30を連結するための測定用エレメント支持体連結枠、32は複数のフィルタについてはフィルタ支持枠5を連結するためのフィルタ連結枠、33は図1等と同様の免疫学的測定用エレメント、40は図4と同様のサンプル容器、41は図6と同様の測定容器、42は容器、43は容器連結枠である。

【0083】このように構成された免疫学的測定用エレメントについて、その機能、動作、使用法等を説明する。

【0084】図1において、導入用パッド1は、測定用エレメント支持体30内部に被検液、洗浄液等を導き入れ、さらに放出用パッド2へ液体を移動させるものである。放出用パッド2は、その内部に酵素標識抗体94が含浸されており、導入用パッド1から導かれた液体へ酵素標識抗体94を放出し、連絡用パッド3へ液体を移動させる。連絡用パッド3は放出用パッド2から導かれた液体をフィルタ4へ移動させるものである。フィルタ4には標準抗原93（または抗体）が固定化されており、標準抗原93は連絡用パッド3から導かれた酵素標識抗体94と抗原抗体反応をおこない、吸水パッド7へ液体を移動させる。フィルタ操作ハンドル6はフィルタ4を測定用エレメント支持体30から分離するためにフィルタ支持枠5の一端に設けたものである。吸水パッド7はフィルタ4より導かれた液体を保持するためのものである。

【0085】また、通気口21は、毛細管現象により被検液、洗浄液等を上昇させるかまたは負圧力を発生させる機器と接続するために測定用エレメント支持体30の一端に設けた開口であり、導入口22は、導入パッド1に被検液、洗浄液等を導入するために測定用エレメント支持体30の他端に設けた開口である。測定用エレメント支持体30は、導入用パッド1、放出用パッド2、連絡用パッド3、フィルタ4、吸水パッド7等を被覆し一体化するためのものであり、液体が透過しない材質で構成される。

【0086】さらに、第1の酵素95は酵素標識抗体94に結合させた標識物質としての酵素であり、第2の酵素96はフィルタ4に固定化させた酵素である。フィルタ4に固定化させた酵素96は標識物質としての酵素標識抗体94の基質が不安定な物質で要時調整を必要とする場合に用いるものであり、前記基質を比較的安定な水溶性物質から生産するものを使用することができる。

【0087】本実施の形態における免疫学的測定方法は図2に示すように4段階の工程（A-1. 測定用エレメント作製工程50）、（A-2. 反応工程51）、（A

17

ー 3. 測定工程 5 2) および (A-4. 演算工程 5 3) から構成される。

【0088】免疫学的測定用エレメント 3 3 は A-1. 測定用エレメント作製工程 5 0 によって作製し、ユーザが使用できるように用意される。この A-1. 測定用エレメント作製工程 5 0 について説明する。

【0089】A-1. 測定用エレメント作製工程 5 0 は、標準抗原 9 3 をフィルタ 4 に固定化し、酵素標識抗体 9 4 を放出用パッド 2 に保持し、導入用パッド 1、連絡用パッド 3、吸水パッド 7 を測定用エレメント支持体 3 0 で密閉支持して免疫学的測定用エレメント 3 3 を完成させる工程である。以下に示す (a) ~ (j) のステップから構成され、(a) ~ (g) が標準抗原 9 3 をフィルタ 4 に固定化するステップ、(h) ~ (i) が酵素標識抗体 9 4 を放出用パッド 2 に保持させるステップ、(j) が免疫学的測定用エレメント 3 3 を組み立てるステップである。

【0090】A-1 (a) は標準抗原 9 3 をフィルタ 4 に固定化するステップである。フィルタ 4 に標準抗原 9 3 の溶液を接触させ、フィルタ 4 の表面および細孔内に標準抗原 9 3 を非特異的に固定化する。標準抗原 9 3 は測定対象となる抗原 (測定対象抗原) で単一種のアレルゲンの溶液を使用する。

【0091】フィルタ 4 は、多孔質状、不織布状、網状、のいずれか一種の形状または複数種類が複合した形状で、ニトロセルロース、ポリスチレン、ガラス、等のいずれか一種の材質または複数種類が複合した材質で、粒子保持能が $0.1 \mu\text{m}$ 以上 $100 \mu\text{m}$ 以下であり、独立した単一又は複数のフィルタの集合体でもよい。例えば、図 7 に示すようにフィルタ 4 をフィルタ操作作用ハンドル 6 と一体となったフィルタ支持枠 5 で支持し、さらに 8 個のフィルタ操作作用ハンドル 6 をフィルタ連結枠 3 2 で一体に構成したものが使用できる。

【0092】標準抗原 9 3 溶液としては、測定対象と同一種の抗原であるアレルゲンの溶液が用いられる。ここでいう同一種とは抗体が結合する抗原決定基を有することである。標準抗原 9 3 の濃度は溶液は $0.0001 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは $0.001 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ が用いられる。標準抗原 9 3 の濃度が $0.001 \mu\text{g}/\text{mL}$ よりも少なくなるにつれ、十分な抗原量をフィルタ 4 に固定化することが不可能となる傾向が認められ、また、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ よりも多くなるにつれ、吸着量が飽和して未反応の抗原が増加し、経済性が悪くなるという傾向が認められるので、いずれも好ましくない。

【0093】標準抗原 9 3 溶液の溶媒としては、りん酸緩衝液、ホウ酸緩衝液が用いられる。他の溶液で pH を一定に保持することができるものでもよい。上記緩衝液に塩類、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウムを溶解して使用するのが好ましい。緩衝液の pH としては pH 5

18

~ pH 9、好ましくは pH 6 ~ pH 8 が用いられる。

【0094】標準抗原 9 3 溶液によるフィルタ 4 の処理条件としては pH 5 ~ pH 9、処理時間 10 分 ~ 48 時間、処理温度 4°C ~ 40°C 、好ましくは pH 6 ~ pH 8、処理時間 30 分 ~ 2 時間、処理温度 4°C ~ 30°C が用いられる。この条件で浸漬処理することによりフィルタ 4 に標準抗原 9 3 であるアレルゲンを高密度で非特異吸着させることが可能となる。

【0095】A-1 (b) は未反応の標準抗原 9 3 を洗浄除去するステップである。緩衝液で、フィルタ 4 を好ましくは 1 回 ~ 10 回、更に好ましくは 2 回 ~ 5 回洗浄することで、未反応の標準抗原 9 3 を効率的に除去することができ、以降の測定の精度を向上させることができる。

【0096】A-1 (c) は第 2 の酵素 9 6 をフィルタ 4 に固定化するステップである。フィルタ 4 に酵素 9 6 を接触させ、フィルタ 4 の表面および細孔内に酵素 9 6 を非特異的に固定化する。このステップは測定用の発色基質溶液調整が簡便となるように行うステップであり、必要に応じて操作を行う。

【0097】第 2 の酵素 9 6 は測定に使用する酵素標識抗体 9 4 に結合した第 1 の酵素 9 5 の基質を生成するものを使用する。例えば、酵素 9 5 にペルオキシダーゼを使用する場合、その基質である過酸化水素を生成させるグルコースオキシダーゼを使用することができる。この例の場合、液体の状態で供給する必要のある過酸化水素ではなく固体の粉末状等の形態でグルコースを供給することで過酸化水素を生成させ、生成した該過酸化水素を基質としてペルオキシダーゼによる反応を起こさせることが可能となり、測定用の発色基質溶液調整が簡便となる。

【0098】酵素 9 6 溶液の濃度は $0.0001 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは $0.001 \mu\text{g}/\text{mL}$ ~ $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ が用いられる。酵素 9 6 の濃度が $0.001 \mu\text{g}/\text{mL}$ よりも少なくなるにつれ、十分な抗原量をフィルタ 4 に固定化することが不可能となる傾向が認められ、また、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ よりも多くなるにつれ、吸着量が飽和して未反応の抗原が増加し、経済性が悪くなるという傾向が認められるので、いずれも好ましくない。

【0099】酵素 9 6 溶液の溶媒としては、りん酸緩衝液、ホウ酸緩衝液が用いられる。他の溶液で pH を一定に保持することができるものでもよい。上記緩衝液に塩類、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウムを溶解して使用するのが好ましい。緩衝液の pH としては pH 5 ~ pH 9、好ましくは pH 6 ~ pH 8 が用いられる。酵素 9 6 溶液によるフィルタ 4 の処理条件としては pH 5 ~ pH 9、処理時間 10 分 ~ 48 時間、処理温度 4°C ~ 40°C 、好ましくは pH 6 ~ pH 8、処理時間 30 分 ~ 2 時間、処理温度 4°C ~ 30°C が用いられる。この条件で浸

19

漬処理することによりフィルタ4に酵素96を高密度で非特異吸着させることが可能となる。

【0100】A-1(d)は未反応の酵素96溶液を洗浄除去するステップである。このステップはA-1

(c)と同様、測定用の発色基質溶液調整が簡便となるように行うステップであり、必要に応じて操作を行う。緩衝液で、フィルタ4を好ましくは1回～10回、更に好ましくは2回～5回洗浄することで、未反応の酵素96を効率的に除去することができ、以降の測定の精度を向上させることができる。

【0101】A-1(e)はブロッキング剤でフィルタ4の非特異吸着面を被覆するステップである。フィルタ4にブロッキング剤溶液を接触させ、フィルタ4の非特異吸着面を被覆した。ブロッキング剤溶液によるフィルタ4の処理条件としてはpH5～pH9、処理時間10分～48時間、処理温度4℃～40℃、好ましくはpH6～pH8、処理時間30分～2時間、処理温度5℃～30℃が用いられる。この条件で浸漬処理することによりフィルタ4に残存する非特異吸着を起こす表面にブロッキング剤を非特異吸着させ、以後他の有機物の非特異吸着が極力おこらないようになり、より精度の高い測定が可能となる。

【0102】ブロッキング剤として、牛血清アルブミン、牛乳由来カゼイン、ゼラチン等のタンパク質を含有したブロッキング剤溶液を使用する。ブロッキング剤溶液の溶媒としてはりん酸緩衝液、ホウ酸緩衝液が用いられる。他の溶液でpHを一定に保持することができるものでよい。上記緩衝液に塩類、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウムを溶解して使用するのが好ましい。緩衝液のpHとしてはpH5～pH9、好ましくはpH6～pH8が用いられる。緩衝液のpHがpH6より小さくなるにつれ、安定なブロッキング剤の非特異吸着を測定用反応容器に発生させることができないという傾向が認められ、またpH8よりも大きくなるにつれても、安定な抗ブロッキング剤の非特異吸着を測定用反応容器に発生させることができないという傾向が認められるので、いずれも好ましくない。

【0103】A-1(f)は未反応のブロッキング剤を洗浄除去するステップである。界面活性剤含有緩衝液で、フィルタ4を1回～10回、好ましくは2回～5回洗浄することで、未反応のブロッキング剤を効率的に除去することができ以降の測定の精度を向上させることができる。ここで、界面活性剤としてポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン(80)ソルビタンモノラウレートを含有させて使用するものである。界面活性剤の濃度は好ましくは0.001W/V%～1W/V%、好ましくは0.01W/V%～0.2W/V%が用いられる。界面活性剤の濃度が0.01W/V%より少なくなるにつれ未反応のタンパク質等を効率的に除去することができず以降の測定の精

20

度を低下させる傾向が認められ、また、0.2W/V%より多くなるにつれ、発泡が著しく起こるため洗浄し難くなるという傾向が認められるので、いずれも好ましくない。

【0104】A-1(g)はフィルタ4を保存可能とする処理を行うステップである。保存手段として凍結乾燥法、風乾等を用いて、フィルタ4を長期安定化した状態とする。

【0105】A-1(h)は酵素標識抗体94を放出用パッド2に含浸させるステップである。放出用パッド2に、測定対象となる抗原(アレルゲン)に特異的に結合する抗体91(図15参照)に酵素95を結合させた酵素標識抗体94の溶液を接触させて含浸させる。

【0106】放出用パッド2は多孔質状、不織布状、網状のいずれか一種類の形状または複数種類が複合した形状でガラス、セルロース、ポリプロピレン、フッ素樹脂等のいずれか一種類の材質または複数種類が複合した材質で非特異的結合が極力起こらない様に例えばポリビニルアルコール等で正面を親水化処理したもの等が使用できる。

【0107】酵素標識抗体94溶液の濃度は0.0001μg/mL～100μg/mL、好ましくは0.001μg/mL～10μg/mLが用いられる。酵素標識抗体94の濃度が0.001μg/mLよりも少なくなるにつれ、充分な酵素標識抗体94をフィルタ4に供給することが不可能となる傾向が認められ、また、10μg/mLよりも多くなるにつれ、フィルタ4に固定化した標準抗原93への酵素標識抗体94の吸着量が飽和し、未反応の酵素標識抗体94が増加し、経済性が悪くなるという傾向が認められるので、いずれも好ましくない。酵素標識抗体94溶液の溶媒としては、A-1(a)に示す標準抗原93溶液と同様のものが使用できる。

【0108】A-1(i)は酵素標識抗体94が含浸した放出用パッド2を保存可能とする処理を行うステップである。保存手段として凍結乾燥法、風乾等を用いて、フィルタ4を長期安定化した状態とする。

【0109】A-1(j)は免疫学的測定測定用エレメント33を組み立てるステップである。フィルタ4、放出用パッド2、導入用パッド1、連絡用パッド3、吸水パッド7を組み合わせて測定用エレメント支持体30で密閉し、免疫学的測定用エレメント33とする。

【0110】導入用パッド1と連絡用パッド3は多孔質状、不織布状、網状のいずれか一種類の形状または複数種類が複合した形状でガラス、セルロース、ポリプロピレン、フッ素樹脂等のいずれか一種類の材質または複数種類が複合した材質で非特異的結合が極力起こらない様に例えばポリビニルアルコール等で正面を親水化処理したもの等が使用できる。

【0111】吸水パッド7は多孔質状、不織布状、網状のいずれか一種類の形状または複数種類が複合した形状

21

でガラス、セルロース、ポリプロピレン、フッ素樹脂等のいずれか一種類の材質または複数種類が複合した材質のもの等が使用できる。

【0112】組み上がった免疫学的測定エレメント33の概略断面図を図1に、その斜視図を図8に示す。

【0113】次に、A-1. 測定エレメント作製工程50で作製された免疫学的測定用エレメント33を用いて、アレルゲン濃度を測定する本発明の実施の形態1による免疫学的測定方法の(A-2. 反応工程51)、

(A-3. 測定工程52)、(A-4. 演算工程53) 10 について説明する。

【0114】まずA-2. 反応工程51について説明する。

【0115】これは抗原量に比例した量の酵素標識抗体94を免疫学的測定用エレメント33のフィルタ4に固定化された標準抗原93と被検液等に含まれる抗原(測定対象抗原)92とに分配させ、分配させた酵素標識抗体94を分離する工程である。以下に示す(a)～(c)のステップから構成される。

【0116】A-2(a)は測定用エレメントと被検液 20 を接触させるステップ54である(図3)。

【0117】図4(a)に示すように、サンプル容器40に標準液あるいは被検液70を定量注ぎ、測定用エレメントの導入口22を標準液あるいは被検液70に接触させる。標準液あるいは被検液70は毛細管現象によって上昇するが、必要があれば、測定用エレメント支持体30の通気口21から負圧力を供給する。負圧力の供給手段としてはシリンジを測定用エレメント支持体30の通気口21に接続してシリンジの内筒を動かし、シリンジ外筒と内筒で構成される空間を大きくする方法や真空 30 ポンプのサクション側に測定用エレメント支持体30の通気口21を接続して真空ポンプで発生する負圧力を供給する方法等が考えられ、安定的な標準液あるいは被検液70の移動や、速い標準液あるいは被検液70の移動、自由度の高い測定用エレメント支持体30の配置方向の提供を行うことができるため精度良く、迅速に、自由度高く抗原または抗体を測定することができる。標準液により得られたデータを基に検量線を作成し、この検量線を利用して被検液の濃度を算出する。

【0118】標準液あるいは被検液70は毛細管現象または負圧力により測定用エレメント支持体30を上昇し、導入用パッド1を経由して連絡用パッド2に達する。連絡用パッド2において酵素標識抗体94が標準液あるいは被検液70に溶解する。さらに標準液あるいは被検液70は上昇して連絡用パッド3を経由してフィルタ4に達する。フィルタ4において、酵素標識抗体94は、フィルタ4に固定化された標準抗原93の濃度と、標準液あるいは被検液70中の抗原(測定対象抗原)の濃度とに応じて分配される。この後、図4(b)に示すように、さらに標準液あるいは被検液70は上昇して吸 50

22

水パッド7に到達する。

【0119】サンプル容器40は、例えば図9に示すように容器42を容器連結棒43で一体に構成した形状のもの等が使用できる。その材質としてはポリプロピレン、ポリエチレン、フッ素樹脂等、タンパク質との非特異吸着が起こりにくいものを使用できる。材質に関わらず、タンパク質との非特異吸着を低減させる処理を施して使用することもできる。

【0120】A-2(b)は免疫学的測定用エレメント33を洗浄するステップ55である。

【0121】図5(a)に示すように、サンプル容器40に洗浄液71を定量注ぎ、免疫学的測定用エレメント33の導入口22を洗浄液71に接触させる。必要があれば、測定用エレメント支持体30の通気口21から負圧を供給する。洗浄液71は毛細管現象または負圧により測定用エレメント支持体30内を導入用パッド1、連絡用パッド2、連絡用パッド3、フィルタ4、吸水パッド7まで上昇し、上昇する間に測定用エレメント支持体30内の特異吸着していない酵素標識抗体94の大部分を図5(b)に示すように、吸水パッド7に移行させる。洗浄液71としては例えば、A-1(f)ステップで示した界面活性剤含有緩衝液が使用できる。サンプル容器40はA-2(a)ステップで示したサンプル容器40と同じものが使用できる。

【0122】A-2(c)は免疫学的測定用エレメント33とフィルタ4とを分離するステップである。免疫学的測定用エレメント33からフィルタ4をフィルタ操作ハンドル6を利用して分離する。

【0123】次に、A-3. 測定工程52について説明する。

【0124】これは、フィルタ4に結合した酵素標識抗体94と発色基質を添加して酵素反応で発色させ、発色の度合いを測定する工程である。以下に示す(a)～(c)のステップから構成される。

【0125】A-3(a)はフィルタ4と基質溶液72を接触させるステップである。図6(a)に示すように、測定容器41に基質溶液72を一定量注ぎ、フィルタ4を基質溶液72に接触させる。例えば、図10に示すように複数個を同時に測定することもできる。基質溶液72は溶質として標識物質に応じた発色基質を含有し、発色基質としては例えば標識物質が酵素95でペルオキシダーゼの場合はオルトフェニレンジアミン二塩酸塩、3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン、2,2'-アジノービス、3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸二アンモニウム塩、5-アミノサリチル酸等が使用でき、また、基質溶液72は基質として過酸化水素を含有し、溶媒としては緩衝液を使用し、pH 5.0±0.1の0.1mol/Lクエン酸緩衝液等が使用できる。また、過酸化水素を発生する酵素96がフィルタ4に固定化されている場合は、酵素96の基質を

23

加えることで過酸化水素を要時調整することなく簡便に基質溶液の調整ができる。例えば、酵素 9 5 がペルオキシダーゼの場合、酵素 9 6 としてグルコースオキシダーゼ、その基質としてグルコースを使用することができる。

【0126】測定容器 4 1 としては、例えば、図 9 に示すように容器 4 2 を容器連結枠 4 3 で一体に構成した形状のもの等が使用できる。その材質としてはポリスチレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、アクリル樹脂等の光学的に透明な合成樹脂を用いて形成されたものが使用できる。

【0127】A-3 (b) は基質溶液 7 2 を発色させるステップ 5 6 である。

【0128】図 6 (b) に示すように、測定容器 4 1 内の基質溶液 7 2 中の発色基質がフィルタ 4 上の酵素 9 5 によって発色する。フィルタ 4 と基質溶液 7 2 の反応条件としては、反応時間 1 分～60 分、反応温度 10℃～40℃、好ましくは反応時間 2 分～20 分、反応温度 15℃～30℃が用いられる。この条件で反応させることによりフィルタ 4 に残留している標識物質が発色基質から酵素反応によって色素を効率的に生成させることが可能となる。反応時間が 2 分より短くなるにつれ十分な発色が得られなくなるという傾向が認められ、また、20 分より長くなるにつれ、測定感度が低下する傾向が認められるので、いずれも好ましくない。反応温度が 15℃より低くなるにつれ、酵素の活性が低下するという傾向が認められ、また、30℃より高くなるにつれ、酵素の活性が低下する傾向が認められるので、いずれも好ましくない。

【0129】A-3 (c) は酵素反応を停止させるステップである。あらかじめ反応停止液を測定容器 4 1 に適量添加し、酵素反応を停止させる。反応停止液は溶質として標識物質に応じた反応停止剤を含有し、反応停止剤として硫酸、塩酸、硝酸、リン酸、水酸化ナトリウム等が用いられる。

【0130】A-3 (d) は発色波長における発色の度合いの測定ステップである。測定容器内で発色した色素が特異的に吸収する波長の光を吸光度として吸光度計で測定する。

【0131】次に、A-4、演算工程 5 3 について説明する。

【0132】これは標準抗原溶液の検量線より抗原濃度の換算を行う工程である。以下に示す (a) のステップから構成される。

【0133】A-4 (a) は換算ステップである。A-1、工程 5 0～A-3、工程 5 2 の操作により別途求めた標準抗原溶液の検量線を使用して、被検液の吸光度より被検液の濃度を演算し算出する。

【0134】なお、以上の説明では、抗原の測定について説明したが、抗原と抗体を逆にして抗体の測定につ

24

ても同様に実施可能である。

【0135】以上のように本実施の形態によれば、供給者側で反応済み免疫学的測定用エレメント 3 3 を作製し、免疫学的測定用エレメント 3 3 と被検液とを反応させることで、被検液の測定対象抗原 9 2 の濃度に応じて酵素標識抗体 9 4 の分配をおこなわせ、免疫学的測定用エレメント 3 3 のフィルタ 4 に固定化した標準抗原 9 3 と結合した酵素標識抗体 9 4 の標識物質の濃度を定量することで被検液中の測定対象抗原の濃度を測定することが可能で、従来の測定方法、例えば、現在最も一般的に利用されているサンドイッチ E L I S A 法と本実施の形態における測定方法とを比較すると、サンドイッチ E L I S A 法が 2 工程の抗原抗体反応工程、2 工程の洗浄操作を必要とするのに対して、本実施の形態における測定方法は 1 工程の抗原抗体反応工程、洗浄操作は 1 工程で簡易にでき、簡便、迅速、安価に抗原（または抗体）を定量することができる特異的な免疫学的測定方法及び免疫学的測定用エレメントを提供することができる。

【0136】

【実施例】本発明の実施例では、実施の形態 1 における免疫学的測定方法及び実施の形態 1 による免疫学的測定用エレメント 3 3 を用いて、コナヒョウヒダニのアレルゲンである r D e r f i l l の濃度の測定をおこなった。

【0137】図 1 2 は本発明の実施例で作成したコナヒョウヒダニのアレルゲン r D e r f i l l の検量線を示すグラフである。実施の形態 1 における免疫学的測定方法は、4 段階の工程（A-1、測定用エレメント作製工程 5 0）、（A-2、反応工程 5 1）、（A-3、測定工程 5 2）および（A-4、演算工程 5 3）から構成される。

【0138】最初に A-1、測定用エレメント作製工程 5 0 について説明する。

【0139】工程 5 0 の A-1 (a) は標準抗原 9 3 をフィルタ 4 に固定化するステップである。

【0140】フィルタ 4 に標準抗原 9 3 の溶液を接触させ、フィルタ 4 の表面に標準抗原 9 3 を非特異的に固定化した。標準抗原 9 3 としてコナヒョウヒダニの虫体由来アレルゲンを大腸菌の遺伝子操作により生産させ精製した r D e r f i l l を使用した。その希釈には pH 7、4±0.2 のダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（以下、「PBS」と記載する）を使用し、濃度は 1 μg/mL に調整した。フィルタ 4 はニトロセルロース製で、直径 5mm で、粒子保持能が 10 μm のものを使用した。図 7 に示すフィルタ 4 をフィルタ操作用ハンドル 6 と一体となったフィルタ支持枠 5 で支持し、さらに 8 個のフィルタ操作用ハンドル 6 をフィルタ連結枠 3 2 で一体に構成したものが使用した。標準抗原 9 3 溶液によるフィルタ 4 の処理条件は pH 7、4±0.2、処理時間 2 時間、処理温度 25℃を用いた。

【0141】A-1 (b) は未反応の標準抗原 9 3 を洗

50

25

浄除去するステップである。緩衝液で、フィルタ4を3回洗浄して、未反応の標準抗原93を除去した。緩衝液としてPBSを用いた。

【0142】A-1(c)は第2の酵素96をフィルタ4に固定化するステップである。フィルタ4に酵素96を接触させ、フィルタ4の表面に酵素96を非特異的に固定化した。第1の酵素95としてペルオキシダーゼを使用したため、その基質である過酸化水素を生成させるグルコースオキシダーゼを酵素96として使用した。酵素96溶液の濃度は $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、溶媒としてPBSを用い、処理条件としては $\text{pH}7.4 \pm 0.2$ 、処理時間2時間、処理温度 25°C で処理した。

【0143】A-1(d)は未反応の酵素96溶液を洗浄除去するステップである。緩衝液で、フィルタ4を3回洗浄して、未反応の酵素96を除去した。緩衝液としてPBSを用いた。

【0144】A-1(e)はブロッキング剤でフィルタ4の非特異吸着面を被覆するステップである。フィルタ4にブロッキング剤溶液を接触させ、フィルタ4の非特異吸着面を被覆した。ブロッキング剤溶液によるフィルタ4の処理条件は $\text{pH}7.4 \pm 0.2$ 、処理時間1時間、処理温度 25°C を用いた。ブロッキング剤として、 $10\text{g}/\text{L}$ の牛血清アルブミンを混合したPBS溶液（以下、「PBS-B」と記載する）を使用した。

【0145】A-1(f)は未反応のブロッキング剤を洗浄除去するステップである。界面活性剤含有緩衝液で、フィルタ4を3回洗浄することで未反応のブロッキング剤を除去した。界面活性剤含有緩衝液としてPBSに $0.05\text{w}/\text{v}\%$ ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート含有し、 $\text{pH}7.4 \pm 0.2$ の溶液（以下、「PBS-T」と記載する）を使用した。

【0146】A-1(g)はフィルタ4を保存可能とする処理を行うステップである。保存手段として風乾等を用いて、フィルタ4を長期安定化した状態とした。

【0147】A-1(h)は酵素標識抗体94を放出用パッド2に含浸させるステップである。放出用パッド2に酵素標識抗体94として抗DerfIIマウスモノクローナルIgG抗体に西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼを標識化した抗体（以下、「13A4PO」と記載する）を使用し、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の13A4POのPBS-T溶液を接触させて含浸させた。放出用パッド2は不織布状、表面をポリビニルアルコールで親水化処理したポリプロピレン製のものを使用した。

【0148】A-1(i)は酵素標識抗体94が含浸した放出用パッド2を保存可能とする処理を行うステップである。保存手段として凍結乾燥法を用いて、フィルタ4を長期安定化した状態とした。

【0149】A-1(j)は免疫学的測定用エレメント33を組み立てるステップである。フィルタ4、放出用パッド2、導入用パッド1、連絡用パッド3、吸水パ

26

ッド7を組み合わせる測定用エレメント支持体30で密封し免疫学的測定用エレメント33とした。詳細な免疫学的測定用エレメント33の構成と組み立て方法は後述する。導入用パッド1と連絡用パッド3は不織布状、表面をポリビニルアルコールで親水化処理したポリプロピレン製でA-1(h)ステップで示した放出用パッド2と同様のものを使用した。吸水パッド7は不織布状、ガラス製のものを使用した。

【0150】次に、免疫学的測定用エレメント33の構成と組み立て方法を図11に基づいて説明する。

【0151】フィルタ4は円形でリング状のフィルタ支持体5に固定されており、フィルタ支持体5の上下にはそれぞれOリング36が取り付けられ、フィルタ支持体5の一端にはフィルタ操作ハンドル6が取り付けられている。測定用エレメント支持体30はパイプ状の構造をしており、中間部にフィルタ支持体5を挿入する開口が 180° の半円状に、フィルタ支持体5の上下のOリング36で密着するように設けられており、上部には通気口21を設けた測定用エレメント上部蓋34、下部には導入口22を設けた測定用エレメント下部蓋35を組み合わせたことが可能な構造となっている。測定用エレメント支持体30にフィルタ支持体5を挿入後、測定用エレメント支持体30上部より吸水パッド7を挿入し、測定用エレメント上部蓋34を測定用エレメント支持体30に固定する。さらに、連絡用パッド3、放出用パッド2、導入用パッド1をこの順番に測定用エレメント支持体30下部より挿入し、測定用エレメント下部蓋35を測定用エレメント支持体30に固定する。

【0152】次にA-2、反応工程51について説明する。

【0153】A-2(a)は免疫学的測定用エレメント33と被検液を接触させるステップである。サンプル容器40として図9に示す8個の容器40を容器連結枠43で一体に構成した形状で、あらかじめタンパク質との非特異吸着が起こりにくいようにBSAでブロッキング処理したポリスチレンのものを使用した。標準抗原rDerfIIを $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ より3倍に順次PBS-Tで希釈して7種の標準希釈列の溶液を調製し、7種の標準希釈列の溶液とブランク液としてPBS-Tをサンプル容器40の8個の容器42にそれぞれ $250\mu\text{L}$ 注いだ。免疫学的測定用エレメント33の8個を該サンプル容器40のそれぞれの容器40に各1個ずつ、免疫学的測定用エレメント33の通気口21が上になるように挿入し、導入口22と容器40内の液体とを接触させた。

【0154】標準液あるいは被検液70は毛細管現象または負圧力により測定用エレメント支持体30を上昇し、導入用パッド1を経由して連絡用パッド2に達する。連絡用パッド2において酵素標識抗体94が標準液あるいは被検液70に溶解する。さらに標準液あるいは

27

被検液 70 は上昇して連絡用パッド 3 を經由してフィルタ 4 に達する。フィルタ 4 において酵素標識抗体 94 は、フィルタ 4 に固定化された標準抗原 93 の濃度と標準液あるいは被検液 70 中の抗原 92 (測定対象抗原) の濃度に応じて分配される。この後、図 4 (b) に示すように、さらに標準液あるいは被検液 70 は上昇して吸水パッド 7 に到達する。

【0155】A-2 (b) は測定用エレメントを洗浄するステップである。新たなサンプル容器 40 として図 9 に示す 8 個の容器 42 を容器連結枠 43 で一体に構成した形状で、あらかじめタンパク質との非特異吸着が起こりにくいように BSA でブロッキング処理したポリスチレンのものを使用した。洗浄液 71 として PBS-T をサンプル容器 40 の 8 個の容器 42 にそれぞれ 250 μ L 注いだ。上記免疫学的測定用エレメント 33 の 8 個を該サンプル容器 40 のそれぞれの容器 42 に各 1 個ずつ、免疫学的測定用エレメント 33 の通気口 21 が上になるように挿入し、導入口 22 と容器 42 内の液体とを接触させた。洗浄液 71 は毛細管現象または負圧により測定用エレメント支持体 30 内を導入用パッド 1、連絡用パッド 2、連絡用パッド 3、フィルタ 4、吸水パッド 7 まで上昇し、上昇する間に測定用エレメント支持体 30 内の特異吸着していない酵素標識抗体 94 の大部分を図 5 (b) に示すように、吸水パッド 7 に移行させる。

【0156】A-2 (c) は免疫学的測定用エレメント 33 とフィルタ 4 とを分離するステップである。上記免疫学的測定用エレメント 33 の測定用エレメント支持体 30 からフィルタ 4 をフィルタ操作用ハンドル 6 を利用してそれぞれ分離する。

【0157】次に、A-3. 測定工程 52 について説明する。

【0158】A-3 (a) はフィルタ 4 と基質溶液 72 を接触させるステップである。基質溶液 72 を測定容器 41 の 8 個の容器 42 にそれぞれ 100 μ L 注ぎ、前記フィルタ 4 をそれぞれの容器 42 に入れて 15 分間、25℃で反応させ、フィルタ 4 に固定化した第 2 の酵素 96 であるグルコースオキシダーゼにより過酸化水素を生成させ、ペルオキシダーゼの基質とした。測定容器 41 として図 9 に示す 8 個の容器 42 を容器連結枠 43 で一

$$[\text{吸光度}(-)] = 0.252 \times \ln \{ rDerfII \text{濃度} (\mu\text{g/mL}) \} + 1.880 \dots \dots \dots (1)$$

図 12 より明らかなように本実施例では 0.002 $\mu\text{g/mL}$ 以上、0.03 $\mu\text{g/mL}$ 以下の $rDerfII$ が測定可能であることがわかる。ここで $rDerfII$ 濃度と吸光度のこの範囲における相関係数は 0.995 であり、危険率 1% で優位に相関が認められた。任意の被検液に対してこの検量線と同条件で吸光度測定をおこなえば、式 (1) より被検液の濃度を算出することができる。

【0166】従来の方法では $rDerfII$ 濃度の測定

28

体に構成した形状で、あらかじめタンパク質との非特異吸着が起こりにくいように BSA でブロッキング処理したポリスチレンで光学的に透明なものを使用した。容器 42 は水平断面積約 24 mm^2 (内径 5.5 mm) で、深さ約 11.5 mm の円筒形のものを使用した。基質溶液 72 として 10 mL の pH 5.0 \pm 0.1 の 0.1 mol/L クエン酸緩衝液 (以下、「クエン酸緩衝液」と記載する) に 4 mg のオルトフェニレンジアミン二塩酸塩 (以下、「OPD」と記載する) を溶解させ、グルコースを 18 mg/mL 溶解させたものを調整して使用した。

【0159】A-3 (b) は基質溶液 72 を発色させるステップである。反応時間 15 分、反応温度 25℃の条件で反応させ、第 1 の酵素 95 であるペルオキシダーゼにグルコースオキシダーゼにより生成した過酸化水素を基質として、発色基質である OPD を発色物質へと変化させることによって発色させた。

【0160】A-3 (c) は酵素反応を停止させるステップである。あらかじめ反応停止液として 2 N の硫酸を使用し、測定容器 41 の 8 個の容器 42 にそれぞれ 50 μL 注ぎ、酵素反応を停止させた。

【0161】A-3 (d) は発色波長における発色の度合いの測定ステップである。測定容器 41 内で発色した色素が特異的に吸収する 490 nm の光を吸光度計で測定した。

【0162】次に、A-4. 演算工程 53 について説明する。

【0163】これは標準抗原溶液の検量線より抗原濃度の換算を行う工程である。以下に示す (a) のステップから構成される。

【0164】A-4 (a) は換算ステップである。A-1. 工程 50 ~ A-3. 工程 52 の操作により求めた標準抗原溶液の検量線を使用して、被検液の吸光度より被検液の濃度を演算し算出する。ブランク液である PBS-T 溶液の吸光度を各標準抗原溶液の吸光度より差し引き検量線を作成すると、図 12 のグラフが得られた。図 12 で縦軸は吸光度を示す。図 12 の直線部より最小 2 乗法で回帰直線を求めると次式 (1) が得られた。

【0165】

に 24 時間と長い測定時間を必要とし、かつ高価な測定装置が必要であるのに対して、本実施例はあらかじめ作製した免疫学的測定用エレメント 33 を利用することでユーザの測定操作は 30 分で完了させることができた。

【0167】なお、本実施例以外にも抗原 (または抗体) を測定する免疫学的測定用エレメントは種々考えることが出来る。また、より自動化を推進した装置、検出法が電気化学的、放射性同位体の検出を利用したものとの組み合わせ等が考えられる。

50

29

【0168】

【発明の効果】以上説明したように本発明の請求項1に記載の免疫学的測定方法によれば、測定用エレメントを用意し、測定対象抗原を含有する被検液を測定用エレメントの一方端から負圧力または毛細管現象により含浸させ、測定対象抗原と特異的に結合することができ標識物質が結合された抗体を担持させた部位にまで測定用エレメント内の含浸をすすませて抗体を被検液に混入し、さらに測定用エレメントの他方端側に位置し標準抗原が固定化された部位にまで含浸がすすむと、標準抗原と測定対象抗原との間で抗体を抗原抗体反応によりそれぞれの抗原濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成し、標準抗原が固定化された部位の抗原抗体複合体に含まれる標識物質の量の測定を行い、測定対象抗原の濃度を標識物質の量より換算することにより、操作を簡単なものとするので、抗原または抗体の濃度を迅速簡便に低価格で測定することができるという有利な効果が得られる。

【0169】請求項2に記載の免疫学的測定方法によれば、測定用エレメントを用意し、測定対象抗体を含有する被検液を測定用エレメントの一方端から負圧力または毛細管現象により含浸させ、測定対象抗体と特異的に結合することができ標識物質が結合された抗原を担持させた部位にまで測定用エレメント内の含浸をすすませて抗原を被検液に混入し、さらに測定用エレメントの他方端側に位置し標準抗体が固定化された部位にまで含浸がすすむと、標準抗体と測定対象抗体との間で抗原を抗原抗体反応によりそれぞれの抗体濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成し、標準抗体が固定化された部位の抗原抗体複合体に含まれる標識物質の量の測定を行い、測定対象抗体の濃度を前記標識物質の量より換算することにより、操作を簡単なものとするので、抗原または抗体の濃度を迅速簡便に低価格で測定することができるという有利な効果が得られる。

【0170】請求項3に記載の免疫学的測定方法によれば、脱着自在なフィルタに測定対象抗原と同一種の標準抗原を一定量固定化し、多孔質で液体を吸収する第1の吸収体と第2の吸収体とが接触した状態で前記フィルタを挟んで配置し、測定対象抗原と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗体を含有した第3の吸収体を第2の吸収体に接触した状態で配置し、被検液を導入するための第4の吸収体を第3の吸収体に接触した状態で配置し、全体を気密性の密閉部材で覆い、密閉部材の第4の吸収体側に導入口を配置し、密閉部材の第1の吸収体側に通気口を配置した測定用エレメントを用意し、測定対象抗原を含有する被検液を測定用エレメントの導入口に接触させ、被検液を負圧または毛細管現象により第4の吸収体から第1の吸収体まで移動させ、第3の吸収体から抗体を被検液中に放出させ、フィルタに固定化された標準抗原と測定対象抗原とで抗体を抗原抗体反応

30

によりそれぞれの抗原濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成させた後、フィルタを測定用エレメントより分離し、フィルタの標識物質の測定をおこない、測定対象抗原の濃度を標識物質より換算することにより、別途作製され保存された上記測定用エレメントを用いることで測定を簡便・迅速化することができ、また、抗原抗体反応は被検液と測定用エレメントの接触を行うときの一回であるため短時間のうちに、かつ複数回の反応であるならば各反応間に必要となる洗浄を不要化することができ、測定用エレメントの脱着自在なフィルタに固定化された一定量の標準抗原と測定対象抗原によって、被検液が測定用エレメントを通過する際に、放出用パッドから標準抗原と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗体が被検液に溶解し、溶解した上記抗体をそれぞれの抗原濃度に応じて所定の割合に分配させ、分配された抗体の量と標識物質との間には所定の関係があるため、フィルタと結合した標識物質を測定することによって、測定対象抗原の濃度を算出することができるという有利な効果が得られる。

【0171】請求項4に記載の免疫学的測定方法によれば、脱着自在なフィルタに測定対象抗体と同一種の標準抗体を一定量固定化し、多孔質で液体を吸収する第1の吸収体と第2の吸収体とが接触した状態でフィルタを挟んで配置し、測定対象抗体と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗原を含有した第3の吸収体を第2の吸収体に接触した状態で配置し、被検液を導入するための第4の吸収体を第3の吸収体に接触した状態で配置し、全体を気密性の密閉部材で覆い、密閉部材の第4の吸収体側に導入口を配置し、密閉部材の第1の吸収体側に通気口を配置した測定用エレメントを用意し、測定対象抗体を含有する被検液を測定用エレメントの導入口に接触させ、被検液を負圧または毛細管現象により第4の吸収体から第1の吸収体まで移動させ、第3の吸収体から抗原を被検液中に放出させ、フィルタに固定化された標準抗体と測定対象抗体との間で抗原を抗原抗体反応によりそれぞれの抗体濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成させた後、フィルタを測定用エレメントより分離し、フィルタの標識物質の測定をおこない、測定対象抗体の濃度を標識物質より換算することにより、別途作製され保存された上記測定用エレメントを用いることで測定を簡便・迅速化することができ、また、抗原抗体反応は被検液と測定用反応容器の接触を行うときの一回であるため短時間のうちに、かつ複数回の反応であるならば各反応間に必要となる洗浄を不要化することができ、測定用反応容器に固定化された一定量の標準抗体と測定対象抗体によって、被検液に添加した上記抗原をそれぞれの抗体濃度に応じて所定の割合に分配させ、分配された抗原の量と標識物質との間には所定の関係があるため、測定用反応容器または被検液と結合した標識物質を測定することによって、測定対象抗体の濃度を算

31

出することができるという有利な効果が得られる。

【0172】請求項5に記載の免疫学的測定方法によれば、請求項1乃至4のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、負圧力を発生する負圧発生手段を通気口に接続して、被検液の移動を行うことにより、安定的な被検液の移動や、速い被検液の移動、自由度の高い配置方向の提供を行うことができるため、精度良く、迅速に、自由度高く抗原または抗体を測定することができるという有利な効果が得られる。

【0173】請求項6に記載の免疫学的測定方法によれば、請求項1乃至5のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、標識物質が酵素であって、標識物質量の測定を吸光度を測定することにより行うことにより、酵素を利用することで、迅速に、容易に、安価に抗原または抗体を測定することができるという有利な効果が得られる。

【0174】請求項7に記載の免疫学的測定方法によれば、請求項1乃至5のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、標識物質が蛍光物質であって、標識物質量の測定を蛍光強度により行うことにより、蛍光物質を利用することで、迅速に、容易に抗原または抗体を測定することができるという有利な効果が得られる。

【0175】請求項8に記載の免疫学的測定方法によれば、請求項6に記載の免疫学的測定方法において、標識物質の酵素を第1の酵素としたとき、フィルタの固相には抗原または抗体に加えて第2の酵素が固定化されていることにより、酵素を利用することで、標識物質としての酵素の基質を第2の酵素により供給することで測定用発色基質液の調整を簡便にできるという有利な効果が得られる。

【0176】請求項9に記載の免疫学的測定方法によれば、請求項3乃至8のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、フィルタの形状が多孔質状、不織布状、網状のいずれか1種類の形状または複数種類が複合した形状であることにより、抗原または抗体が吸着する単位体積当たりの表面積を大きくすることができ、抗原抗体反応を短時間かつ容易に行うことができるという有利な効果が得られる。

【0177】請求項10に記載の免疫学的測定方法によれば、請求項3乃至9のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、フィルタがニトロセルロース、ポリスチレン、ガラスのいずれか1種類の材質または複数種類が複合した材質であることにより、フィルタへの抗原または抗体の単位面積当たりの吸着量を大きくすることができ、抗原抗体反応を短時間かつ容易に行うことができるという有利な効果が得られる。

【0178】請求項11に記載の免疫学的測定方法によれば、請求項3乃至10のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、フィルタの粒子保持能が0.1 μm ~ 100 μm であることにより、被検液が濁質を含有す

32

るために測定への影響がある場合、フィルタの最上流部にて該濁質を捕捉し、抗原抗体反応をフィルタ内部において濁質の影響を排除しておこなえ、濁質除去等の前処理を必要としないため測定を簡便かつ短時間に行うことができるという有利な効果が得られる。

【0179】請求項12に記載の免疫学的測定方法によれば、請求項3乃至11のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、測定用エレメントを複数複合したことにより、複数の被検液を同時に測定できるようになり、一検体当たりの測定を簡便かつ短時間に行うことができるという有利な効果が得られる。

【0180】請求項13に記載の免疫学的測定方法によれば、請求項1乃至12のいずれか1に記載の免疫学的測定方法において、免疫反応および酵素反応の温度を一定に保持する温度保持装置を備えたことにより、反応が最適化し、安定化されるようになり、測定を短時間に安定して行うことができるという有利な効果が得られる。

【0181】請求項14に記載の免疫学的測定用エレメントによれば、測定対象抗原と同一種の標準抗原を一定量固定化した脱着自在なフィルタと、フィルタに近接して配置された吸水パッドと、フィルタの前記吸水パッドと逆側に近接するように配置された連絡用パッドと、連絡用パッドのフィルタと逆側に近接するように配置され、測定対象抗原と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗体を含有した放出用パッドと、放出用パッドの連絡用パッドと逆側に近接するように配置された導入用パッドと、全体を覆う気密性の測定用エレメント支持体と、導入用パッドの放出用パッドと逆側に配置された導入口と、吸水パッドのフィルタと逆側に配置された通気口とを有することにより、測定対象抗原を含有する被検液をサンプル容器に注ぎ、被検液と測定用エレメントの導入口を接触させ、被検液を負圧または毛細管現象により上昇させ、放出用パッドから抗体を被検液中に放出させ、フィルタに固定化された標準抗原と測定対象抗原との間で抗体を抗原抗体反応によりそれぞれの抗原濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成させた後、フィルタを測定用エレメントより分離し、フィルタの標識物質量の測定をおこない、測定対象抗原の濃度を該標識物質より換算することができるという有利な効果が得られる。また、免疫学的測定用エレメントにより測定を簡便・迅速化することができ、さらに、抗原抗体反応は被検液と測定用反応容器の接触を行うときの一回であるため短時間のうちに、かつ複数回の反応であるならば各反応間に必要となる洗浄を不要化することができ、測定用反応容器に固定化された一定量の標準抗原と測定対象抗原によって、被検液に添加した抗体をそれぞれの抗原濃度に応じて所定の割合に分配させ、分配された抗体量と標識物質には所定の関係があるため、測定用反応容器または被検液と結合した標識物質量を測定することによって、測定対象抗原の濃度を算出することができる

いう有利な効果が得られる。

【0182】請求項15に記載の免疫学的測定用エレメントによれば、測定対象抗体と同一種の標準抗体を一定量固定化した脱着自在なフィルタと、フィルタに近接して配置された吸水パッドと、フィルタの吸水パッドと逆側に近接するように配置された連絡用パッドと、連絡用パッドのフィルタと逆側に近接するように配置され、測定対象抗体と特異的に結合することができ標識物質を結合した抗原を含有した放出用パッドと、放出用パッドの連絡用パッドと逆側に近接するように配置された導入用パッドと、全体を覆う気密性の測定用エレメント支持体と、導入用パッドの放出用パッドと逆側に配置された導入口と、吸水パッドのフィルタと逆側に配置された通気口とを有することにより、測定対象抗体を含有する被検液をサンプル容器に注ぎ、被検液と測定用エレメントの導入口を接触させ、被検液を負圧または毛細管現象により上昇させ、放出用パッドから抗原を被検液中に放出させ、フィルタに固定化された標準抗体と測定対象抗体との間で抗原を抗原抗体反応によりそれぞれの抗体濃度に応じて分配して抗原抗体複合体を形成させた後、フィルタを測定用エレメントより分離し、フィルタの標識物質量の測定をおこない、測定対象抗体の濃度を該標識物質量より換算することができるという有利な効果が得られる。また、免疫学的測定用エレメントにより測定を簡便・迅速化することができ、さらに、抗原抗体反応は被検液と測定用反応容器の接触を行うときの一回であるため短時間のうちに、かつ複数回の反応であるならば各反応間に必要となる洗浄を不要化することができ、測定用反応容器に固定化された一定量の標準抗体と測定対象抗体によって、被検液に添加した抗原をそれぞれの抗体濃度に応じて所定の割合に分配させ、分配された抗原量と標識物質との間には所定の関係があるため、測定用反応容器または被検液と結合した標識物質量を測定することによって、測定対象抗体の濃度を算出することができるという有利な効果が得られる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントの概略断面図

【図2】本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した主要な工程を示す工程図

【図3】本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した主要なステップを示すステップ図

【図4】(a) 本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した反応工程の接触のステップを説明するためのエレメント・サンプル容器の概略断面図

(b) 本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した反応工程の接触のステップを説明するためのエレメント・サンプル容器の概略断面図

【図5】(a) 本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した反応工程の洗浄のステップを

説明するためのエレメント・サンプル容器の概略断面図

(b) 本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した反応工程の洗浄のステップを説明するためのエレメント・サンプル容器の概略断面図

【図6】(a) 本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した測定工程の発色のステップを説明するための測定容器の概略断面図

(b) 本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントを使用した測定工程の発色のステップを説明するための測定容器の概略断面図

【図7】本発明の実施の形態1におけるフィルタの斜視図

【図8】本発明の実施の形態1における免疫学的測定用エレメントの斜視図

【図9】本発明の実施の形態1における測定容器の斜視図

【図10】本発明の実施の形態1における反応工程の発色ステップでのフィルタと測定容器の部分拡大図

【図11】本発明の実施の形態1による免疫学的測定用エレメントの断面図

【図12】本発明の実施例で作成したコナヒョウヒダニのアレルゲンrDerfIIの検量線を示すグラフ

【図13】従来のサンドイッチELISA法の主要工程を示す工程図

【図14】従来のサンドイッチELISA法の反応工程の主要なステップを示すステップ図

【図15】測定用反応容器における反応を示す反応説明図

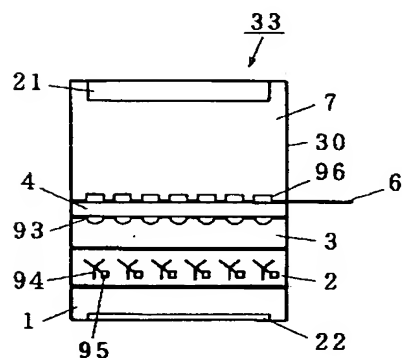
【符号の説明】

- | | |
|----|-------------------|
| 1 | 導入用パッド |
| 2 | 放出用パッド |
| 3 | 連絡用パッド |
| 4 | フィルタ (部位) |
| 5 | フィルタ支持枠 |
| 6 | フィルタ操作用ハンドル |
| 7 | 吸水パッド |
| 21 | 通気口 |
| 22 | 導入口 |
| 30 | 測定用エレメント支持体 |
| 31 | 測定用エレメント支持体連結枠 |
| 32 | フィルタ連結枠 |
| 33 | 免疫学的測定用エレメント |
| 34 | 測定用エレメント上部蓋 |
| 35 | 測定用エレメント下部蓋 |
| 36 | Oリング |
| 40 | サンプル容器 |
| 41 | 測定容器 |
| 42 | 容器 |
| 43 | 容器連結枠 |
| 50 | A-1. 測定用エレメント作製工程 |

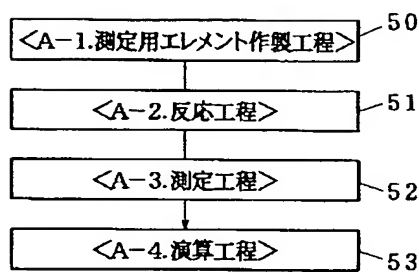
- 51 A-2. 反応工程
 52 A-3. 測定工程
 53 A-4. 換算工程
 54 A-2(a). 接触のステップ
 55 A-2(b). 洗浄のステップ
 56 A-3(b). 発色のステップ
 70 標準液 (被検液)

- 71 洗浄液
 72 基質溶液
 92 測定対象抗原
 93 標準抗原
 94 酵素標識抗体
 95 第1の酵素 (標識物質)
 96 第2の酵素

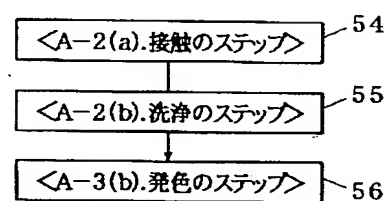
【図1】



【図2】

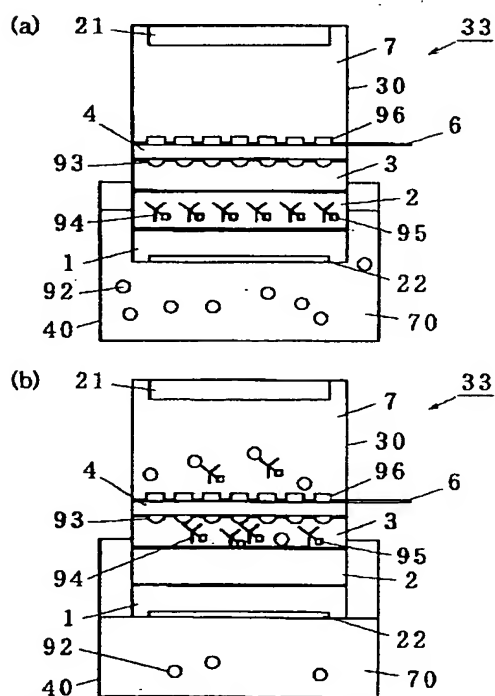


【図3】

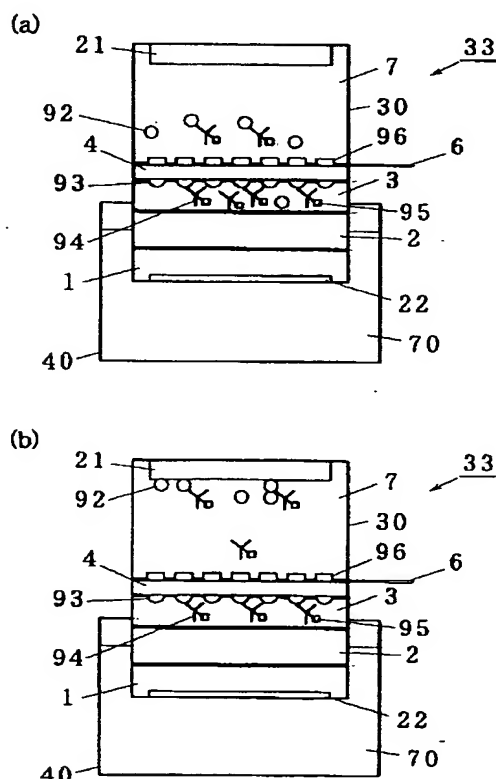


【図5】

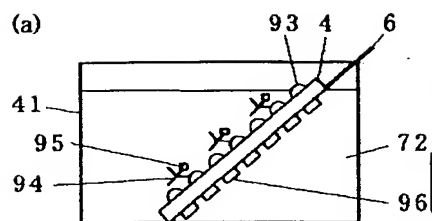
【図4】



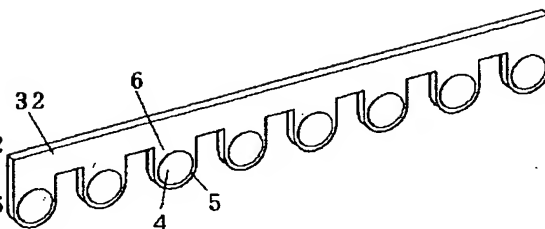
- | | | |
|---------------|----------------|-----------------|
| 1 導入用パッド | 22 導入口 | 94 酵素標識抗体 |
| 2 放出用パッド | 30 測定用エレメント支持体 | 95 第1の酵素 (標識物質) |
| 3 遮断用パッド | 33 測定用エレメント | 96 第2の酵素 |
| 4 フィルタ (部位) | 40 サンプル容器 | |
| 6 フィルタ操作用ハンドル | 70 標準液、被検液 | |
| 7 吸水パッド | 92 測定対象抗原 | |
| 21 通気口 | 93 標準抗原 | |



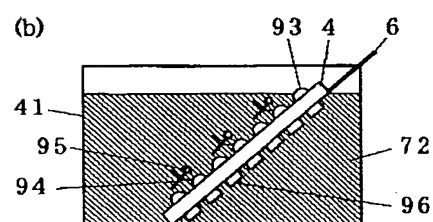
【図6】



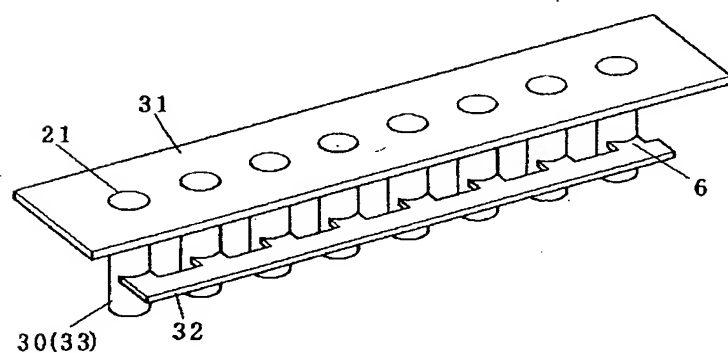
【図7】



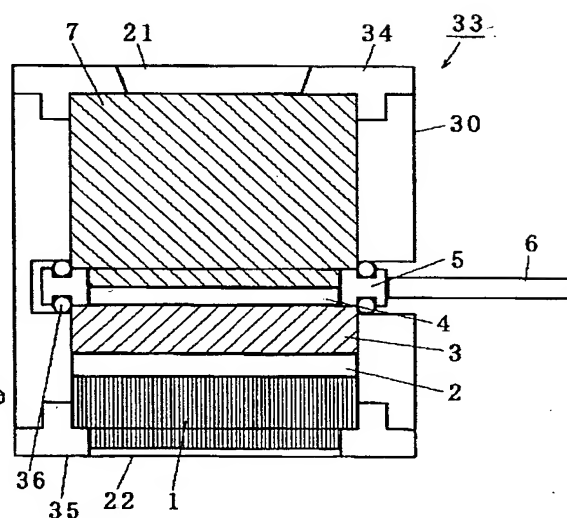
【図11】



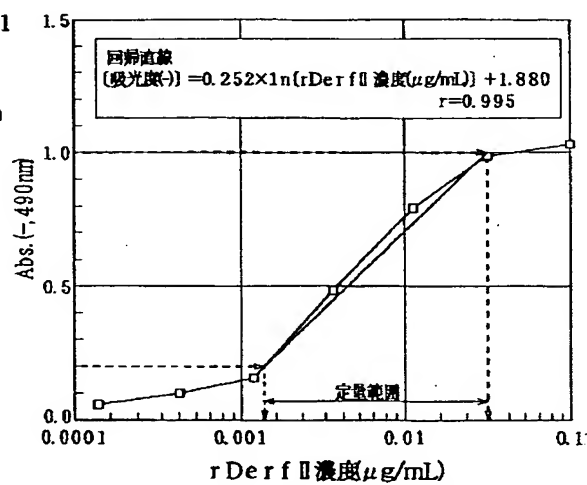
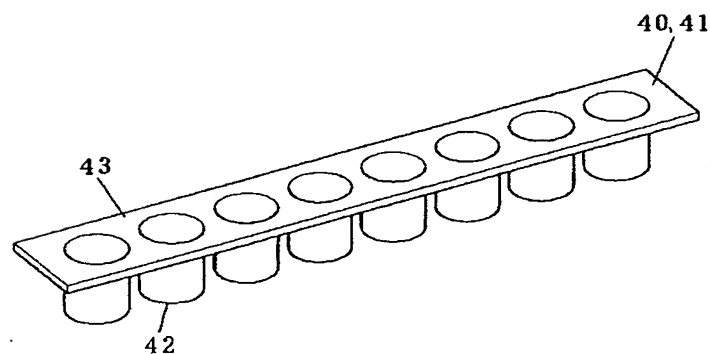
【図8】



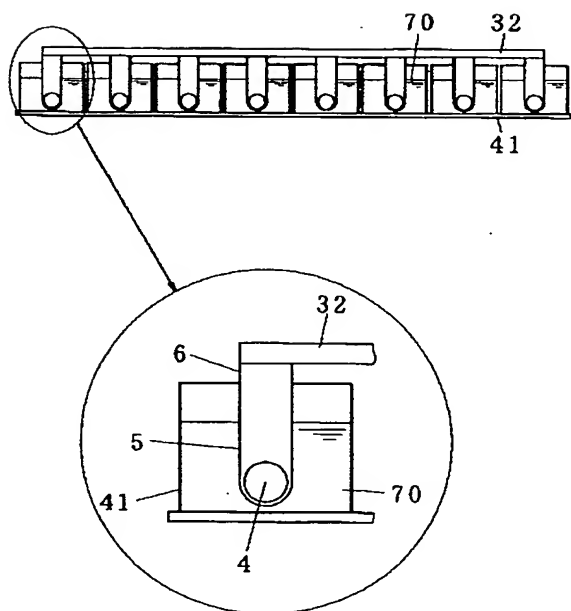
【図9】



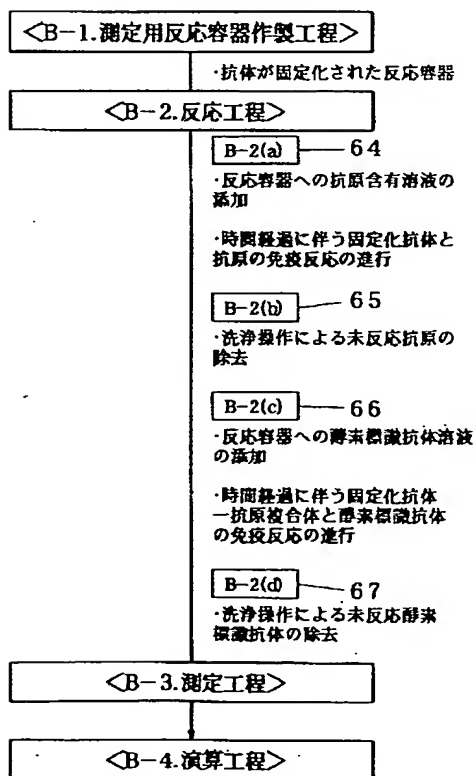
【図12】



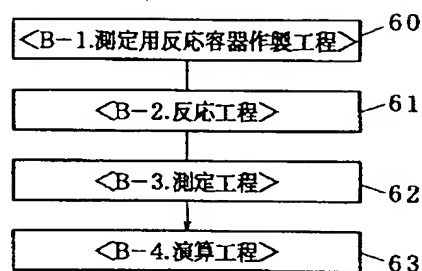
【図10】



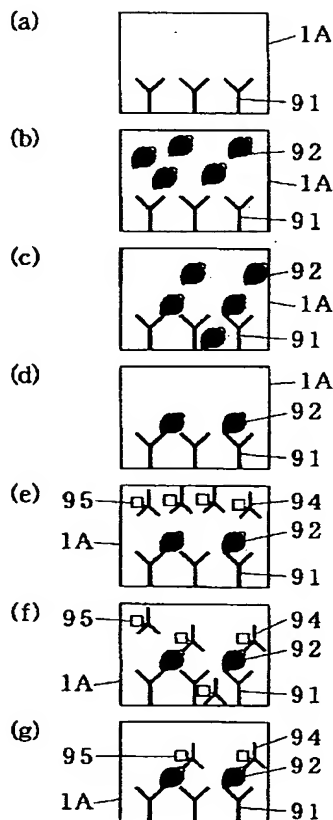
【図14】



【図13】



【図15】



THIS PAGE BLANK (USPTO)